UNIVERSITÉ DE STRASBOURG – FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1931—1932 N° 78

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACTINOMYCOSES

Recherches morphologiques et biologiques concernant deux Actinomyces pathogènes pour l'homme et les animaux de laboratoire.

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 23 juin 1932
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention PHARMACIE)

par

MAURICE ANTONIOLI
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

MM. A. SARTORY, *PROFESSEUR, PRÉSIDENT*
F. JADIN „ } *JUGES*
Y. VOLMAR „ }

STRASBOURG
IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1932

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG – FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1931—1932 N° 78

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACTINOMYCOSES

Recherches morphologiques et biologiques concernant deux Actinomyces pathogènes pour l'homme et les animaux de laboratoire.

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 23 juin 1932
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention PHARMACIE)

par

MAURICE ANTONIOLI
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse :

MM. A. SARTORY, *PROFESSEUR, PRÉSIDENT*
F. JADIN „ } *JUGES*
Y. VOLMAR „ }

STRASBOURG
IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1932

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. JADIN, *Doyen*, O ❋, I ⚲, ⚷
A. SARTORY, *Assesseur*, C. ❋, I ⚲, C ⚷
CUVIER, *Secrétaire*.

PROFESSEURS

MM	JADIN, O ❋, I ⚲, ⚷	Pharmacie chimique.
	A. SARTORY, C. ❋, I ⚲, C ⚷	Bactériologie.
	LAVIALLE, I ⚲, ⚷	Botanique.
	LABORDE, ❋, I ⚲	Chimie organique
	VOLMAR, I ⚲	Analyse chimique.
	LOBSTEIN, ❋, ⚷, I ⚲	Matière médicale.
	GUILLAUME, ❋, ⚷, ⚲	Pharmacie galénique

PROFESSEUR HONORAIRE

M. BRÆMER, ❋, I ⚲, O ⚷

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	LABORDE, ❋, I ⚲	Chimie biologique.
	GUILLAUME, ❋, ⚷, ⚲	Zoologie.
	VOLMAR, I ⚲	Chimie minérale.
	LOBSTEIN, ❋, ⚷, I ⚲	Hydrologie et Hygiène.
	BRÆMER, ❋, I ⚲, O ⚷	Législation et Déontologie
	LAPP, A. ⚲	Physique.
	COLLARD, I ⚲, ⚷	Toxicologie.
	R. SARTORY ⚷	Cryptogamie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	LAPP, A. ⚲	Chimie pharmaceutique.
	COLLARD, I ⚲ ⚷, ...	Chimie et Physique.
	BOHN ⚲	Histoire naturelle.
	R. SARTORY ⚷	Bactériologie et Parasitologie.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548008_0026

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

En témoignage
de ma plus grande affection

A Monsieur A. SARTORY

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Commandeur de la Légion d'Honneur
Président du Jury de ma Thèse

A MES JUGES :

Monsieur JADIN

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de Strasbourg
Officier de la Légion d'Honneur

Monsieur VOLMAR

Professeur à la Faculté
de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de profonde gratitude

INTRODUCTION

De nos jours les parasitologues se rendent compte, en parcourant la littérature mycologique, de l'importance croissante des maladies humaines causées par les champignons inférieurs. On doit, dans ce domaine, assigner une place prépondérante aux affections dues à des Microsiphonées et plus particulièrement aux représentants du genre Actinomyces qui se retrouvent dans l'étiologie d'un nombre considérable de maladies mycosiques.

Au cours de notre séjour au Laboratoire de Bactériologie et de Cryptogamie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, nous avons pu suivre de nombreuses recherches sur ce terrain et notre maître, Monsieur le Professeur A. Sartory, nous a demandé d'étudier en détail deux Actinomyces isolés de lésions humaines. Le premier provenait d'expectorations prélevées chez une femme suspecte de tuberculose pulmonaire et soignée comme telle depuis des années; le deuxième a pu être décelé dans le pus de glandes sous-maxillaires.

Sachant toute l'importance de ces affections, leur confusion possible avec la tuberculose et comprenant tout l'intérêt d'établir de plus en plus une séparation entre ces deux types de maladies, nous avons accepté de nous livrer à ces recherches délicates et minutieuses.

Notre travail se divise en deux parties :

La première a pour objet de retracer à grands traits l'historique des Actinomyces et des Actinomycoses.

Dans la seconde nous exposons nos recherches personnelles en insistant tout particulièrement sur les techniques adoptées et sur les faits importants, qui se dégagent de nos recherches.

Pour chaque parasite étudié nous avons adopté l'ordre suivant :

I. Observation du malade.

II. Examen du parasite dans les lésions au moyen de préparations fraîches ou fixées, colorées ou non par les procédés usuels et par des méthodes spéciales.

III. Etude des propriétés de l'organisme en cultures sur les divers milieux.

IV. Examen microscopique du champignon dans les cultures.

V. Propriétés biologiques.

VI. Propriétés biochimiques.

VII. Etude de l'action pathogène expérimentale sur les animaux de laboratoire.

VIII. Recherches sérologiques au moyen du sang du malade : Epreuves de l'agglutination, de la fixation du complément.

Enfin pour ce qui concerne notre deuxième organisme un chapitre est consacré à l'étude de la substance chromogène, quant à sa localisation, aux conditions physiques et chimiques de production du pigment.

Nous étudions en outre la solubilité du colorant, son absorption et nous donnons un aperçu sur son analyse capillaire, sur les méthodes chimiques permettant de l'isoler et enfin sur l'analyse spectroscopique de cette matière colorante.

Dans nos Conclusions générales nous résumons les faits les plus importants qui semblent se dégager de notre expérimentation.

Arrivé au terme de ce travail, il nous est particulièrement agréable d'adresser à notre cher Maître, Monsieur le Professeur A. Sartory l'expression de toute notre gratitude pour l'accueil chaleureux qu'il nous a réservé dans ses laboratoires et pour les directives bienveillantes qu'il n'a cessé de nous prodiguer pendant notre séjour à la Faculté.

Notre reconnaissance va aussi à Monsieur le Professeur Jadin, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg,

nous n'oublierons pas la grande bienveillance qu'il nous a témoignée, et à Monsieur le Professeur VOLMAR, qui ont bien voulu faire partie de notre Jury de Thèse.

Nous avons trouvé une aide précieuse et amicale auprès de nos bons amis MM. René SARTORY, Chargé de Cours et Chef des Travaux et J. MEYER, Assistant; qu'ils reçoivent ici l'expression de notre affection reconnaissante bien sincère.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE PREMIER

Généralités sur les Actinomyces, leur place dans la classification.

Les Actinomyces sont très répandus dans la nature. On les a trouvés jusqu'ici chez l'homme, chez les animaux les plus divers, surtout chez le bœuf, le porc, plus rarement chez le cheval, la chèvre, le chien, les reptiles.

Des cas ont été signalés chez le lapin, le chameau et même chez l'éléphant. TERNI et GALLI VALERIO en ont isolé chez des lézards.

En outre ces microorganismes sont abondamment répandus dans l'air : par exemple l'Actinomyces carneus (1), l'*A. Hofmanni* (2), l'*A. chromogenus* (1), l'*A. violaceus* (1) etc.

GASPERINI (3) en 1890, décrit une nouvelle espèce qu'il a rencontrée dans l'air, à Pise, et qu'il identifie au Streptothrix FOERSTERI; elle dégage une odeur de moisi et produit des croûtes blanches sur les milieux solides.

En 1891 (4), le même auteur a isolé de l'air, à plusieurs reprises, une nouvelle espèce qui donne des cultures présentant une coloration allant du violet au chocolat foncé sur pomme de terre; colorant la gélatine en brun, non pathogène pour le cobaye.

SAN FELICE (5) donne la description de deux Oospora très virulents rencontrés dans l'air : l'*O. alba* et l'*O. II.*,

tous les deux sont pathogènes pour les animaux de laboratoire.

Sartory (6) a isolé de l'air un Oospora non pathogène dont il fait une simple variété du *Streptothrix coelicolor*. Ce champignon cultivé sur pomme de terre produit une teinte bleue, le septième jour, qui s'étend à tout le substratum.

On a rencontré des Actinomyces aussi dans le sol, comme l'A. *carneus* (1), l'A. *Gruberi* (7), etc.

Lombardo Pellegrino (8) a trouvé un nouvel Oospora dans le sol, et lui donna le nom d'*O. viridis*.

Notre Maître (9) a fait l'étude d'un Actinomyces isolé pour la première fois du sol par Poirault, cet organisme colore presque tous les milieux en noir. Il n'est pas pathogène pour les lapins, ni pour les cobayes, ni pour les chiens. Après en avoir donné une description complète, Sartory l'a dédié au botaniste Poirault sous le nom *d'O. Poiraulti*.

Fousek (10) qui a fait des analyses du sol à différentes périodes de l'année, déclare que 6 à 22 % des microorganismes qu'on y rencontre appartiennent au genre *Actinomyces*.

On a encore isolé ces parasites de l'eau, comme l'*A. rosaceus* (11), l'*A. citreus albus* (12), etc.

V. Riegler (13) déclare avoir rencontré ces champignons dans 27 % des eaux minérales analysées.

Rossi Doria a retiré de l'eau l'*Oospora violacea*.

Sauvageau et Radais (14) au mois de juin 1891, en faisant l'analyse d'une eau de conduite, ont observé sur une plaque de gélatine une petite colonie brune, sèche, ridée, s'accroissant très lentement et émettant autour d'elle une teinte brune. Ils ont appelé cette nouvelle espèce *O. Metchnikowi* et l'ont décrite très minutieusement.

Sartory, en analysant une eau de source provenant de la *Charente-Inférieure*, a isolé un Oospora donnant un pigment violé principalement sur gélatine et gélose, non pathogène pour le cobaye; il a identifié cette espèce avec l'*Oospora violacea* de Rossi Doria.

Ajoutons encore, pour souligner la résistance de ces organismes, qu'on a trouvé des Actinomyces dans des sources chaudes, à des températures de 60°-70°.

Un nombre assez important d'espèces ont été rencontrées dans des excréments et sur des matières en décomposition qui semblent être des milieux de prédilection.

Sur les végétaux, en particulier sur les graminées, on les retrouve presque constamment et les cas de contamination de l'homme par le mâchage des chaumes ou des épis sont assez fréquents. On a même retrouvé dans une lésion actinomycosique une arête de graminée couverte de colonies d'Actinomyces.

Sur les carottes, les pommes, les cerises, les fraises, les bananes on les rencontre fréquemment.

Nous nous permettons d'ajouter ici quelques mots sur l'actinomycose de la pomme de terre qui est, par exemple, très répandue en Allemagne, comme le mentionne le professeur Erikson (15). Elle est occasionnée par une série d'Actinomyces, entre autres : 1° l'*A. oeruginosus* Wollenweber (16), (Buckelschorf) ; 2° l'*A. tricolor* et l'*A. intermedius* (Flachschorf) ; 3° l'*A. incanescens* (Tiefschorf) et 4° l'*A. xanthostroma* et l'*A. albus* var. *ochroleucus* (variabler Schorf).

Cette actinomycose n'est pas dangereuse ; elle s'attaque surtout aux pommes de terre en voie de croissance, mais ne fait pas déprécier beaucoup leur valeur et n'est pas une cause de putréfaction. Les pommes de terre atteintes prennent un aspect verruqueux et sont recouvertes souvent d'un petit duvet grisâtre, formé surtout de filaments très ramifiés et de chaînettes de conidies.

Classification botanique.

Elle a fait l'objet de nombreuses controverses et discussions. Les noms les plus divers ont aussi été attribués au parasite. Nous ne nous occuperons pas ici des détails déjà mentionnés par Thiriet (17) dans sa thèse sur les *Oospora* et les oosporoses. Nous ferons simplement remarquer que c'est Harz (18) en 1877 qui, en examinant, sur la demande de Bollinger, des tumeurs du maxillaire d'un bœuf a découvert un parasite auquel il donna le nom d'*Actinomyces bovis*, à cause de sa disposition rayonnée.

En 1875, dans le même mémoire Cohn (19 et 20) décrit le *Cladothrix dichotoma*, champignon filamenteux microsco-

pique abondant dans l'eau renfermant des algues en décomposition et très bien caractérisé par une fausse ramification; il signale, en étudiant les filaments d'apparence mycélienne mentionnés par A. von Graefe puis par Foerster dans le canal lacrymal de l'homme, qu'il considéra ces filaments comme tout à fait particuliers et créa, pour ces raisons, une nouvelle espèce qu'il appela *Streptothrix* Foersteri.

Rappelons en passant le nom de *Discomyces* donné par Rivolta (21) qui prétend avoir décrit l'espèce avant Harz. Dans la littérature c'est à peine si le nom de *Discomyces* est employé.

En 1888 on trouve le nom de *Bactérium actinocladothrix* donné par Affanasiew (22) qui voulait par là bien marquer l'affinité du champignon avec les bactéries.

C'était du reste déjà l'opinion de Baumgartner, Wolf et Israel qui, rappelant les formes principales des *Actinomyces* en filaments simples ou ramifiés, en bâtonnets et coccis, les rattachent aux bactéries pléomorphes, tout près du *Cladothrix*.

En 1889 de Toni et Trevisan (23), qui ont rédigé la partie du *Sylloge fungorum* de Saccardo relative aux *Schizomycètes* et qui connaissaient l'existence du genre *Streptothrix de* Corda (24) ont transformé le *Streptothrix* Cohn en *Nocardia Actinomyces* et l'ont placé dans les *Schizomycètes de* Naegeli.

En 1891, Rossi Doria (1) le dénommait *Streptothrix Actinomyces*.

Sauvageau et Radais (14) déclarent en 1892 que l'*Actinomyces bovis* a été appelé *Nocardia actinomyces* par Toni et Trevisan, *Streptothrix Actinomyces* par Doria et cela contrairement aux règles de la nomenclature; il faudra le faire rentrer dans le genre *Oospora* créé par Walroth en 1883 (25).

Notons encore les noms de *Nocardia bovis* employés par Blanchard en 1895 et de *Cladothrix Actinomyces* que lui donne Macé en 1897.

De notre côté nous ne voulons pas ouvrir à nouveau une discussion sur ces dénominations qui ont fait couler déjà

beaucoup d'encre. Nous nous joignons à LANGERON (26) qui adopte la classification de FOULERTON en 1910 (27) puis de CHALMERS et CHRISTOPHERSON en 1916 (28) qui sont, ajoute-t-il, les seuls auteurs ayant tenté récemment de mettre un peu d'ordre dans le chaos des *Microsiphonés*.

De plus, les travaux intéressants de NEUKIRCH (29) et de MIESCHER (30), faisant suite aux recherches de LEHMANN et de NEUMANN (31), mettent de la lumière sur l'affinité des *Actinomyces* avec le groupe des bacilles de la tuberculose et de la diphtérie, par suite de la ressemblance des formes dans certains milieux de culture.

Nous adoptons donc la classification suivante déjà citée par DUCROUX (32) dans son travail sur les mycoses osseuses.

Actinomycètes :

1° Corynebacterium;
2° Mycobacterium;
3° Microsiphonés.

Les *Microsiphonés* caractérisés par un mycélium continu, de calibre très fin, dont le diamètre n'excède en général pas un μ, se divisent à leur tour en deux genres :

A. *Actinomyces* (HARZ 1877) qui sont des Microsiphonés généralement aérobies, pouvant souvent vivre en cultures anaérobies, produisant des spores, possédant des filaments unicellulaires plus ou moins ramifiés de longueur différente, de largeur comprise en général entre 0,5 μ et 0,8 μ ; plus rarement les limites peuvent descendre jusqu'à 0,3 μ et s'étendre jusqu'à 1.2 μ. Ces organismes sont colorables par la méthode de GRAM.

B. *Actinobacillus* BRUMPT 1910 (33). Microsiphonés aérobies à filaments très réduits présentant l'aspect de streptobacilles, ne prenant pas le GRAM, non acido-résistants.

Une seule espèce est citée dans ce genre, c'est l'*Actinomyces* LIGNIERESI BRUMPT 1910 qui a été isolé plusieurs fois dans des lésions actinomycosiques du bœuf.

RAVAUT et PINOY en 1909 ont observé cette espèce chez l'homme et ont obtenu des cultures à partir du liquide

rachidien d'un malade argentin, atteint d'une otite et d'une mastoïdite aiguës.

Les Actinomyces se divisent en deux sous-genres :

a) Euactinomyces avec la section des Parasitici;

b) Cohnistreptothrix.

Ces derniers sont des Microsiphonés difficiles à cultiver, anaérobies, mais pouvant aussi vivre en aérobie. Ils ne produisent pas d'arthrospores.

Quant à la section des Parasitici, elle se divise en trois sous-sections : Majores, Minores, et Breviores.

1° Sous-section *Majores :* Elle comprend les *Actinomyces* faciles à cultiver, produisant sur les milieux solides une efflorescence blanche, crétacée. Les filaments sont nettement ramifiés, plus volumineux que dans les deux autres groupes, en général non acido-résistants. Les cultures répandent souvent une odeur de moisi. Cultures faciles sur pomme de terre, ainsi que sur gélatine et sur sérum coagulé qui sont tous deux liquéfiés. Il y a sécrétion de diastases qui digèrent l'amidon.

2° Sous-section *Minores :* Ce sont des *Actinomyces* assez faciles à cultiver; les cultures sur milieux solides présentent l'aspect des cultures du bacille tuberculeux; elles sont ternes, poudreuses à la fin, généralement sans odeur. Les filaments presque toujours acido-résistants sont rarement ramifiés. Ils ne liquéfient pas la gélatine et le sérum coagulé ou seulement un des deux; ils végètent pauvrement sur pomme de terre et ne produisent pas de diastases. De tous les Actinomyces, ces espèces sont les plus pathogènes et produisent habituellement des lésions généralisées.

3° Sous-section *Breviores :* Actinomyces difficiles à cultiver. Le milieu le plus favorable est le bouillon peptoné, dans lequel ils forment de petites colonies isolées, collées au fond ou aux parois du tube. Sur milieux solides, les cultures ne sont pas efflorescentes; elles sont généralement sans odeur. Les filaments non ramifiés sont réduits à de courts articles bacilliformes. Ils ne liquéfient ni la gélatine, ni le sérum, ne produisent pas de diastases, ne végètent pas sur pomme de terre.

Chapitre II

Généralités sur les Actinomycoses — Actinomycose pulmonaire

L'Actinomycose est une affection produite chez l'homme et chez les animaux par la pénétration dans l'organisme de champignons appelés Actinomyces.

Bollinger (34) en 1877 a donné la première étude vétérinaire complète de cette maladie du bœuf. Avant lui Davaine en 1850, Rivolta en 1868, Perroncito en 1875 avaient reconnu successivement la nature parasitaire et l'origine cryptogamique de l'affection.

En 1879 Harz (18) a étudié le premier les caractères botaniques de l'agent infectieux et après en avoir donné une description détaillée, il le dénommait *Actinomyces*, à cause de son aspect radié.

Avant que cette maladie ait été décrite chez les animaux, on l'avait déjà signalée chez l'homme, comme le relatent les publications de Dupuytren en 1812, de Robin et Laboulbène en 1833, de Lebert en 1857, mais seulement le parasite n'avait pas été reconnu. Lebert, par exemple, l'avait pris pour des débris d'helminthes.

Ce sont les travaux longs et complets de Bostroem (35), M. Wolf et J. Israel (36) qui nous donnent une description très exacte de l'affection chez l'homme.

Les publications de Bang, Harms, Azary, Lignières et Spitz ont apporté des détails intéressants sur l'étiologie de l'actinomycose.

En 1885 Thomassen (37), un vétérinaire d'*Utrecht*, a découvert un traitement spécifique de la maladie au moyen de l'iodure de potassium.

Rappelons aussi les recherches intéressantes de JOEST et ZUMPE (38) et celles de PONCET et BÉRARD (39) en 1898. Ces deux derniers auteurs ont publié un travail détaillé intitulé : « *Traité clinique de l'Actinomycose humaine* ».

Les affections déterminées par cette maladie ont été longtemps confondues avec des lésions tuberculeuses ou des tumeurs cancéreuses. Cette méprise était explicable, si l'on considère les analogies cliniques de ces diverses affections.

De plus, si l'on pense qu'on a pu isoler des crachats de malades suspects de tuberculose pulmonaire, un Actinomyces acido-résistant qui présente avec le bacille tuberculeux une communauté de caractères, on comprendra mieux encore la possibilité d'une confusion.

Mode d'inoculation.

L'infection a lieu le plus souvent par la voie digestive.

Dans la plupart des cas, les lésions se trouvent dans la région bucco-pharyngée ou à son voisinage; ce qui s'explique facilement, dit LAEDERICH (40), auquel nous avons emprunté une partie des détails de ce chapitre, lorsque l'on considère que c'est chez les animaux herbivores (bovidés, cheval, mouton), que l'Actinomycose est la plus fréquente et qu'il est probable que l'inoculation se fait par l'intermédiaire de brins de paille ou de grains de céréales chargés de spores du parasite et qui blessent la muqueuse pendant la mastication. Les hommes atteints sont le plus souvent des campagnards ou des personnes qui ont l'habitude de mâchonner des chaumes ou des épis de céréales.

L'infection a travers la peau est possible. ILLICH (41) et LIEBLEIN (42) ont recueilli dans une période de 10 ans, 22 cas dans lesquels le champignon a pénétré ainsi dans l'organisme. Une petite écorchure, une lésion cutanée suffisent pour servir de porte d'entrée à l'agent pathogène.

Nous trouvons dans la voie respiratoire une troisième porte d'infection et de propagation. L'inhalation de poussières chargées de spores en est le plus souvent la cause. Quant à la voie lymphatique elle n'entre jamais en jeu.

Nous ne voulons pas rappeler ici toutes les Actinomycoses décrites jusqu'à ce jour et qui sont fort nombreuses. Nous nous arrêterons uniquement aux affections pulmonaires et pour terminer ce chapitre nous donnerons un aperçu des meilleurs traitements trouvés jusqu'ici.

Actinomycose pulmonaire.

L'appareil respiratoire paraît être un champ très favorable au développement des Actinomyces. De toutes les affections occasionnées par ces parasites, l'actinomycose pulmonaire est celle qui a le plus d'analogie avec la tuberculose.

Le début de la maladie est le plus souvent insidieux et simule tous les symptômes de la tuberculose. Le malade tousse, expectore des crachats souvent purulents, blancs avec des parties rouge-orangé, mais différents cependant des crachats d'un individu atteint de pneumonie. Souvent le crachat exhale une odeur fétide, mais ce caractère n'est pas constant.

L'évolution est longue, elle peut durer des mois, des années, elle se fait par poussées entre-coupées de rémissions, comme souvent dans la tuberculose.

Les lésions pulmonaires peuvent envahir la paroi thoracique, le médiastin et le cœur. Dans les cas les plus graves, le malade est frappé de cachexie et simule tout à fait la phtisie tuberculeuse; la guérison est alors rare, la mort survient assez rapidement.

Roger, Sartory et Bory en 1909 (43) ont donné la première observation d'oosporose pulmonaire. Nous la décrirons au début de nos recherches personnelles. Nous rappelons seulement que dans les parties lésées du malade, les auteurs précités ont isolé un parasite qu'ils dénommèrent *Oospora pulmonalis* et dont ils firent l'étude botanique, biologique et expérimentale complète.

L'*O. pulmonalis* est une espèce très délicate, elle ne se développe bien que dans le bouillon maltosé ou les milieux à base de maltose. Sur gélose maltosée, il est possible d'obtenir au bout de 3 à 5 jours quelques colonies grêles, arrondies ou

ovalaires, blanches et faiblement bombées au centre. Les colonies restent toujours isolées et leur épaisseur ne dépasse guère un millimètre.

L'optimum cultural du bouillon maltosé est compris entre + 34° et + 35°. Les caractères botaniques sont les suivants : Filaments mycéliens formant des sortes de lignes brisées dont chaque angle est occupé par un espace très clair. Ces filaments ont une largeur de 0,4 μ à 0,5 μ ; leur longueur est variable, elle peut atteindre 1 mm. 5; ils sont immobiles et munis de ramifications latérales très irrégulièrement distribuées. Dans les vieilles cultures, certaines ramifications se renflent en massue, et les filaments se segmentent en bâtonnets; ces derniers se rassemblent de façon à former de petits faisceaux qu'on pourrait prendre pour des amas de bacilles. Dans d'autres cas, ces filaments se segmentent et produisent de longues séries d'articles ovoïdes ou sphériques désignés sous le nom d'arthrospores.

Les appareils conidiens prennent naissance à l'extrémité libre d'un filament qui s'allonge et se renfle de façon à donner une petite massue dont la base est séparée de la tige mère par une cloison. Le même phénomène se reproduit à plusieurs reprises et les chaînettes de conidies qui en résultent se détachent et se brisent facilement. Les grains mesurent jusqu'à 0,9 μ de diamètre. Telle en est la description donnée par Sartory, puis par Thiriet (17) en 1919 et par Amour Bailly en 1921 (44).

Nous n'insistons pas sur les caractères biochimiques, biologiques et protéolytiques que nous avons résumés plus loin dans un tableau de comparaison avec l'*Actinomyces* étudié par nous.

Sartory a depuis isolé à différentes reprises l'*O. pulmonalis* et par le traitement ioduré instauré en temps utile, les malades ont pu être guéris. Tel, par exemple, le cas signalé par notre Maître en 1911 dans le service du Docteur Michaut à l'hôpital Emile Loubet, où le malade a trouvé la guérison.

Amour Bailly (44) en 1920, en faisant l'analyse d'expectorations d'un homme supposé atteint de tuberculose pulmonaire, a découvert un parasite, qui a été déterminé comme étant l'*O. pulmonalis* (Roger, Sartory et Bory).

Nous ne voulons pas nous étendre plus longtemps sur ce champignon si important. Nous tenons à signaler que l'actinomycose pulmonaire peut être occasionnée par une série d'autres espèces.

Conheim (45), déjà en 1860, en faisant l'autopsie d'un de ses malades, mort d'infection purulente, a décelé la présence de nombreux filaments mycéliens à la base du lobe supérieur du poumon droit, mais il n'a pas reconnu le parasite.

Rullmann (46), en 1902, a isolé d'un crachat une espèce pathogène de *Streptothrix*, qu'il assimila au *Streptothrix odorifera*.

Chalmers et Christopherson, en 1916, ont découvert chez des personnes suspectes de tuberculose pulmonaire plusieurs espèces d'*Actinomyces :* l'*A. Leishmanni*, l'*A. Berestneffi*, l'*A. Foulertoni*.

Aoyama et Miyamoto (47) ont isolé l'*A. japonicus*, voisin de l'*A. asteroides*, d'un abcès pulmonaire.

Foulerton, Berestneff, Bernstein, Petruschki, Verdun, Rossi Doria, etc. ont signalé de nombreux cas de bronchites et de pleurésies purulentes dus à des Actinomyces. Nous ne voulons pas citer ici tous les noms des parasites isolés, étant donné qu'on les trouve dans tous les bons traités de parasitologie.

De plus, ceux que la question intéresse trouveront dans la thèse de Léon Thiriet (17) une étude détaillée des actinomycoses.

Cependant, nous nous en voudrions de ne pas mentionner ici l'*Oospora catarrhalis* isolé dans les laboratoires de notre cher Maître par Bailly (44) en 1920, chez un homme atteint d'une affection des bronches. Cette espèce se distingue déjà de l'*O. pulmonalis* parce qu'elle se développe assez bien sur les milieux usités ordinairement. De plus, les cultures sont caractérisées par des filaments très ramifiés, surtout aux extrémités, ce qui donne l'aspect d'une arborisation très curieuse.

Le même auteur a retrouvé dans une expectoration d'une malade suspecte de tuberculose pulmonaire, l'*O. bron-*

chialis isolé et décrit par SARTORY et LASSEUR (48) en 1916. Les filaments de cette espèce sont tortueux et très ramifiés. Les ramifications latérales sont régulièrement distribuées et ressemblent assez bien aux cornes d'un cerf.

Pour terminer cette étude, nous dirons quelques mots de l'Actinomyces acido-résistant que le professeur SARTORY (49 et 50) a isolé à partir de crachats d'un homme de 53 ans, qui présentait tous les symptômes cliniques d'une tuberculose à la deuxième période.

Il trouva, en effet, lors des examens bactériologiques, le bacille tuberculeux. Cependant un examen très minutieux lui permit de distinguer des bâtonnets de longueur plus grande, munis de ramifications latérales. Il pensa aussitôt qu'un deuxième organisme vivait conjointement au bacille tuberculeux et réussit à l'isoler en ensemençant le parasite d'abord sur des milieux liquides additionnés de maltose, puis en boîte de PÉTRI sur milieu de SABOURAUD.

L'Actinomyces acido-résistant se reconnaît à ses filaments mycéliens tortueux, très ramifiés, d'une largeur comprise entre 0,4 μ et 0,5 μ. Les ramifications sont régulièrement distribuées. On ne trouve pas de formes pectinées, spiralées ou en cornes de cerf. Cet organisme est assez difficile à cultiver, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le milieu de SABOURAUD et le bouillon maltosé à une température comprise entre + 34° et + 36°.

Dans la suite, SARTORY a retrouvé plusieurs fois dans des expectorations de malades des Actinomyces acido-résistants, soit seuls, soit associés au bacille tuberculeux.

THIRIET lui-même a pu isoler, surtout chez les blessés par les gaz asphyxiants, un organisme acido-résistant analogue à celui décrit par SARTORY.

Traitement.

Le traitement de l'actinomycose par la médication iodurée, appliquée d'abord aux bovidés par THOMASSEN (37) fut employé pour l'homme par VAN ITERSON (51) et NETTER (52), qui ont obtenu de si bons résultats que l'iodure est devenu le médicament classique non seulement de l'actino-

mycose, mais encore de toutes les mycoses en général. Cependant il existe des cas où le traitement ioduré est resté presque inefficace. La manière dont l'iodure est administrée, l'étendue et l'ancienneté des lésions, l'existence des infections secondaires pyogènes sont autant de causes de l'échec du traitement.

Nous donnons ici la manière employée par KAREWSKI et URBANTSCHICK (53) pour l'administration de l'iodure de potassium. Ces auteurs commencent avec 1 gr. journellement pendant 8 jours; à partir du 8e jour ils donnent 4 gr.; 6 gr. le 12e jour; 10 gr. le 15e jour, puis 14 gr. du 19e au 24e jour. Ils interrompent alors pendant 24 heures tout traitement et ils recommencent une deuxième fois en débutant par 8 gr. par jour.

Ce traitement a donné des résultats remarquables.

LÆDERICH (40) recommande en outre, s'il existe des fistules, de faire un pansement avec une solution iodo-iodurée; on pourra aussi injecter de petites quantités de cette solution dans les trajets fistuleux.

Avec l'iodure de sodium qui a été substitué à l'iodure de potassium ces derniers temps, les résultats ont été identiques. On a intérêt à employer ce sel parce que les préparations à base de potassium administrées à forte dose ont une action toxique sur le cœur.

Les injections d'extraits glycérinés d'*Actinomyces* ou de *tuberculine* se sont montrées infructueuses, comme du reste les essais de sérothérapie antistaphylococcique ou antistreptococcique.

L'emploi simultané des rayons RŒNTGEN et de l'iode a donné d'excellents résultats. LEVY E. (54) signale le succès obtenu uniquement au moyen des rayons X.

Il ne faut pas oublier l'influence favorable de la thérapeutique arsénicale. FŒDERL (55) estime que le cacodylate de soude est plus actif que l'iodure et décrit le succès acquis par des injections au moyen de cacodylate de soude en solution à 10 % administré à doses croissantes.

De notre côté, pour les cas qui nous intéressent, la guérison des malades a été obtenue :

Pour la première malade, atteinte d'actinomycose pulmonaire, le traitement interne au moyen de doses progressives de *teinture d'iode* a provoqué au début une notable amélioration, puis la guérison.

Quant à la deuxième malade qui présentait une infiltration ganglionnaire sous-maxillaire, le traitement externe par le soleil artificiel en même temps que des frictions à l'iode, ajoutant leurs effets à ceux du traitement interne par la teinture d'iode à doses progressives (7 fois par jour d'une à 60 gouttes), a abouti à des résultats tout à fait positifs. La fillette est guérie à l'heure actuelle.

Chapitre III

Actinomyces chromogènes

Nous n'avons pas pour but de décrire ici tous les *Actinomyces* qui sécrètent des pigments sur les milieux de culture. Nous voulons tout simplement donner un court aperçu des principales espèces chromogènes qui ont été isolées de l'organisme humain.

1° *Actinomyces astéroïdes :* Eppinger (56) 1890.

Ce parasite a été isolé d'un abcès du cerveau par Eppinger en 1890 chez un individu ayant succombé à une méningite cérébro-spinale. Des inoculations à des lapins et à des cobayes faites à partir de culture ont occasionné une « pseudotuberculose ». Dans les tubercules on a retrouvé les mêmes éléments mycéliens que dans l'abcès.

Les filaments qui mesurent de 0,5 μ à 1 μ sont continus, rectilignes ou incurvés, ramifiés en dichotomie ou latéralement, colorables par la méthode de Gram et acido-résistants. On observe aussi des éléments ressemblant à des bacilles et des corpuscules en coccis.

Les cultures sur pomme de terre donnent lieu à la formation de mamelons blancs, neigeux, puis confluents et de couleur rouge brique.

Sur milieu glucosé de Sabouraud à la température de 37°, il donne une culture rose violacé. Sur gélose glucosée à 2 % qui est le meilleur milieu de culture, les colonies qui ressemblent d'abord à des verrues blanchâtres, prennent ensuite une couleur d'ocre de plus en plus accentuée.

G. Sauvageau et M. Radais ont cultivé l'*A. astéroïdes* et ont pu vérifier la plupart des faits indiqués par Eppinger.

2° *Actinomyces Pelletieri* (33), LAVERAN 1906, *Micrococcus Pelletieri* LAVERAN.

Ce champignon occasionne le mycétome à grains rouges signalé dans l'*Inde* et en *Egypte*. Les tumeurs se localisent surtout au pied, au genou et sur le thorax; elles sont remplies d'un pus grisâtre parsemé de petits grains rouges. Parfois même l'affection mycosique peut atteindre le poumon et on trouve alors dans les expectorations du malade de nombreux grains rouges.

Les cultures qui réussissent très bien sur SABOURAUD gélosé à + 27° ont l'aspect d'une pellicule mucilagineuse d'un rouge rubis se détachant facilement. Le champignon se colore par la méthode de GRAM.

Le traitement par l'iodure de potassium donne de très bons résultats.

3° *Actinomyces mordoré* THIRY (57), *Actinomyces rubidaurus* LACHNER (58).

Ce parasite a été isolé d'un exsudat d'angine bénigne accompagné de beaucoup d'œdème par THIRY, qui en donne la description suivante : « L'organisme se présente dans les cultures sous la forme de fins filaments ramifiés, semblables à ceux des organismes du même groupe. Les spores aériennes, habituellement portées par des rameaux dressés, paraissent au microscope incolores comme leur support; en grande masse sur les cultures, elles sont blanches, avec l'aspect poussiéreux et farineux habituel. Parfois, mais assez rarement sur les vieilles cultures très colorées, ces spores, surtout celles qui se forment très près de la surface du milieu, apparaissent rouge rubis. Elles sont plus grosses d'ordinaire que les spores incolores, plus réfringentes et ne semblent pas pouvoir germer sur le liquide d'ARNAUD et de CHARRIN, où les spores incolores germent au contraire rapidement à + 37°. La spore colorée paraît donc une anomalie, une monstruosité qui reste toujours stérile.

Quant aux filaments ramifiés, normalement incolores eux aussi, souvent on les voit s'imprégner uniformément de pigment, d'abord très légèrement et sembler alors bleuâtres ou violet-améthyste; puis l'imprégnation continuant, ils

deviennent violets ou rouge pourpre. Les filaments colorés ne se ramifient plus jamais, ils ne forment plus de spores à leur extrémité libre, on peut les considérer comme morts ou dégénérés; mais nous ne savons pas s'ils sont morts, parce qu'ils sont imprégnés de pigments ou s'ils se sont incrustés parce qu'ils étaient morts. »

L'*A. mordoré* liquéfie la gélatine-peptone en donnant à la surface un collet avec de beaux cristaux mordorés par réflexion, violacés par transparence. Sur pomme de terre il donne lieu à des colorations brun noir en profondeur et présente un reflet mordoré dans les surfaces libres.

Sur gélose-peptone, les colonies s'entourent d'une large auréole mordorée brillante à reflets cuivrés ou bronzés.

4° *Nocardia Jollyi* (59) observé une seule fois à *Salonique*, il a des filaments très fins 0,2 μ à 0,4 μ ; il est colorable par le Ziehl, mais est réfractaire au procédé de Gram. Il n'a ni spores ni massues. Il ressemble au *Nocardia astéroïdes*, mais ses filaments sont plus ténus, moins rameux, moins fragiles. Les cultures réussissent le mieux sur gélose maltosée de Sabouraud où elles poussent rapidement à + 37°. Elles sont strictement aérobies. La pomme de terre glycérinée et la carotte sont de bons milieux. Le champignon forme une masse compacte laissant voir à travers une efflorescence blanche superficielle de nombreuses hernies sous forme de mamelons vivement colorés comme la chair de saumon.

5° *Nocardia* Sabrazes et Rivieri (Verdun 1912).

Ce champignon a été isolé par Rivière (60) en 1896 dans le pus d'abcès multiples et dans les crachats d'un malade présumé tuberculeux. Il est pathogène pour les animaux de laboratoire lorsqu'on injecte en même temps que lui une trace d'acide lactique. Il produit alors une pseudo-tuberculose. Il donne des cultures colorées dès le début en jaune passant au brun. Il liquéfie la gélatine.

6° *Oospora minutissima* (Burchardt 1859). *Microsporoïdes minutissimum* (Neveu-Lemaire 1906), *Discomyces minutissimus* et *Oospora minutissima* (Ridet 1911) (17).

Ce champignon se rencontre dans les squames épidermiques de l'erythrasma. Les filaments mycéliens nombreux

mesurent de 0,6 μ à 1,3 μ, ils sont disposés en faisceaux serrés ou en un réseau inextricable. Cultivé sur pomme de terre, ce parasite donne des colonies formant des trainées d'un rouge vineux. Sur gélatine il produit un enduit brunâtre. Le développement de ce champignon provoque chez l'homme l'*Erythrasma*, mycose cutanée, assez répandue, ne présentant aucune gravité.

7° *Nocardia aurea* (*Streptothrix aurea* du Bois Saint-Severin (61) et Mercier 1895) a été isolé d'un cas de conjonctivité. Les cultures donnent des colonies d'un beau jaune rappelant le chlorure d'or. La description du parasite manque de précision. Le jus de citron empêche l'évolution de ce champignon.

Il y a certainement bien d'autres *Actinomyces* qui sécrètent un pigment sur les milieux de cultures. Cependant nous arrêtons notre énumération, car nous croyons avoir dit le principal pour ce qui concerne les champignons chromogènes qui occasionnent des troubles ou des lésions chez l'homme.

Quant aux pigments sécrétés par ces différentes espèces, les études chimiques et spectroscopiques manquent. Nous dirons dans le chapitre qui suit les principales recherches effectuées dans le domaine intéressant des substances chromogènes produites par les microorganismes.

Chapitre IV

Principaux pigments microbiens étudiés jusqu'à présent

A) Pigment de l'*Actinomyces mordoré* Thiry (57).

La matière colorante isolée de l'*A. mordoré* se dissout dans le chloroforme en donnant une coloration rouge-pourpre. Ce dernier se décolore si on l'agite avec de l'eau alcalinisée au moyen de quelques gouttes de lessive de soude, mais l'eau se colore en bleu ciel. Par addition d'acide, la solution bleue vire au rouge et la matière colorante passe à nouveau dans le chloroforme. Thiry a réussi, en faisant évaporer lentement la solution chloroformique qui est stable, à obtenir des grands cristaux pourpres allongés avec angles très nets. Ces cristaux sont tout différents de ceux qui se forment spontanément dans les cultures. Par extractions et cristallisations successives, il a pu isoler, à un état très pur, la matière colorante pourpre. Dans son travail intéressant, Thiry ne donne pas encore la composition du pigment trouvé.

B) *La chlororaphine.*

La chlororaphine étudiée par Lasseur et Girardet (62) est produite par le *bacillus chlororaphis*. Elle se présente sous forme de belles aiguilles vertes. Elle dérive, par réduction, de la xanthoraphine qui peut être isolée des cultures en saturant ces dernières par le sulfate d'ammoniaque. La solution saturée est traitée d'abord par l'acétone, puis réduite à quelques centimètres-cubes en chauffant jusqu'à 50°. Par refroidissement la xanthoraphine impure cristallise sous forme de longues aiguilles jaunes. Elle est purifiée au moyen d'alcool à 95°.

Par oxydation, la chlororaphine donne naissance à l'oxychlororaphine jaune qui, par réduction, redonne des solutions vertes.

L'oxychlororaphine présente 4 bandes d'absorption.

C) *La Pyocyanine.*

Gessard (63), le premier a démontré que le *bacillus pyocyaneus* peut produire 4 pigments :

une matière colorante bleue : la pyocyanine de Fordos (64);

une substance colorée fluorescente;

une matière colorante rose ou rouge;

un pigment rouge-brun mélanique.

Seule la pyocyanine est spécifique et caractérise le bacille pyocyanique.

Wrede et Strack (65) ont isolé la pyocyanine à l'état de pureté. Avant eux, Fordos (64) avait déjà obtenu cette substance à l'état cristallisé. Pour l'isoler on a eu recours au procédé suivant : les cultures sont traitées par le chloroforme. Si alors on ajoute de l'acide picrique en solution chloroformique, le picrate qui se forme précipite à l'état de fines aiguilles.

Par dissolution dans l'alcool absolu et évaporation, on peut obtenir le produit à l'état de pureté. La pyocyanine se décompose à 60°. La matière colorante résiste peu aux substances oxydantes. La couleur est détruite en peu de temps, si on fait agir sur elle de l'eau oxygénée ou du permanganate de potassium. Le pigment ainsi oxydé peut être facilement réduit par l'action d'une solution alcaline de glucose ou d'hydrosulfite de sodium; la solution devient alors incolore et par agitation à l'air redevient bleue.

La couleur de la pyocyanine se transforme en rouge vineux, si on laisse la substance en contact prolongé avec les acides dilués. On ne peut plus alors extraire de cette solution rouge la matière chromogène au moyen du chloroforme. Il s'est formé un nouveau corps : l'hémipyocyanine.

Wrede et Strack sont arrivés à réaliser la synthèse de la pyocyanine; ils l'ont reconnue comme un dérivé de la

phénacine. Ce corps doit être classé dans le groupe chromogène des *indulines*, des *safranines* et des *indantrènes*.

La *pyocyanine* présente deux belles bandes d'absorption qui la caractérisent nettement.

Avec le chlorhydrate de pyocyanine deux bandes également sont visibles. La première est forte et asymétrique; la deuxième est forte, elle aussi, mais son maximum d'absorption est assez difficile à déterminer.

D) *Violacéines.*

De nombreuses bactéries peuvent produire des pigments violets. Nous ne citerons pas ici toutes les espèces dont la création n'est parfois nullement fondée, ajoute Lasseur et Girardet (62), auxquels nous empruntons les détails qui suivent. Ces auteurs trouvent que la motilité permettrait de grouper toutes les bactéries sécrétant un pigment violet en deux catégories : les genres mobiles et les genres immobiles. Les fouets, dont sont munis les plastides doués de mouvement propre, constituent un excellent caractère de classification.

La plus connue de ces bactéries est le *Bacillus violaceus*.

L'extraction de la matière colorante se fait à partir du voile épais violet foncé que donne le Bacille violet sur les milieux de cultures liquides.

Le voile est lavé à l'eau distillée, desséché dans le vide à froid sur l'acide sulfurique et traité par l'alcool fort. Après filtration la solution est additionnée de quelques centimètres-cubes d'eau, évaporée dans le vide à 40-50° jusqu'à un volume de quelques centimètres-cubes. La matière colorante précipite alors sous forme de flocons violets. On filtre, on lave à l'eau, on dissout le pigment dans l'alcool faible et on évapore dans le vide jusqu'à précipitation de la matière colorante. On reprend par l'éther, on évapore, et on reprend par l'alcool absolu. On filtre, on additionne de quelques centimètres-cubes d'eau et on évapore jusqu'à précipitation de la matière colorante. On lave, on traite par l'alcool fort, on filtre, et, après addition de quelques centimètres-cubes d'eau, on obtient une poudre noire mate.

La matière colorante est purifiée par la méthode capillaire.

Propriétés. — Le pigment est soluble en bleu violacé dans l'alcool éthylique, en bleu dans l'alcool amylique, en violet-rouge dans l'alcool méthylique, l'éther sulfurique et l'acétone. Par contre il est insoluble dans l'éther de pétrole, la benzine, le sulfure de carbone.

La matière colorante se dissout en vert dans la soude concentrée, mais la solution se décolore rapidement et passe au jaune orangé.

Les solutions alcooliques concentrées présentent une large bande d'absorption asymétrique. On peut observer en outre une absorption continue du violet. Par dilution, la bande d'absorption se dédouble en deux bandes.

En solution sulfurique la matière colorante devient bleue; les bandes d'absorption se déplacent et l'on note l'apparition d'une 3^{e} bande très faible qui persiste cependant très longtemps.

Chose curieuse à noter, d'après FORMANEK, les 3 bandes du pigment violet et les 3 bandes de l'oxychlororaphine réduite, paraissent identiques. La matière verte obtenue par réduction de l'oxychlororaphine serait le mélange d'un pigment bleu et d'un jaune. Les 3 bandes appartiennent à la matière bleue. Quant à la matière jaune, elle aurait une absorption dans le violet.

E) *La Prodigiosine.*

La prodigiosine est la matière colorante du *Bacillus prodigiosus*, microorganisme qu'on rencontre très fréquemment dans l'eau et dans le sol. Il n'est pas pathogène pour l'homme. Il a la propriété de donner naissance facilement à des colonies rougeâtres sur les aliments, le pain, les pommes de terre, la viande, ceci à des températures très différentes.

Les travaux fondamentaux sur le *Bacillus prodigiosus* et son pigment déjà résumés par SEVENET (66) dans sa thèse sur le *Bacillus Citrulli* SARTORYI ont été effectués suivant l'ordre chronologique par *Bartholoméo* BIZIO (67) en 1819, par ERDMANN (68) en 1886, par SCHRŒTER (69) en 1875, par GRIFFITH (70) en 1892, par SCHEURLEN (71) et SCHOTTELIUS (72) de 1887 à 1896, par SCHNEIDER (73) en 1887, par

Rosenberg (74) en 1897, par Kraft (75) en 1902. Pendant un certain temps l'étude de la prodigiosine est restée stationnaire.

En 1927 Lasseur et Girardet (62) ont publié leur étude sur les pigments microbiens. La prodigiosine y est décrite en détails. Les propriétés physiques et chimiques ont été déterminées en partant de substances pures, ce qui n'avait pas toujours été le cas jusqu'alors. Une grande attention est accordée à l'étude du spectre d'absorption. Nous n'insistons pas sur ce point ici, puisque nous allons en parler à la fin de ce chapitre. Nous savons que Lasseur et Girardet n'ont pas réussi à faire cristalliser la prodigiosine. Ils ont effectué leurs recherches au moyen du colorant obtenu par extraction alcoolique et purifié par dissolution successive dans l'alcool absolu, l'alcool à 90 % et l'éther. Chaque fois le solvant est évaporé dans le vide. Le pigment contenu dans la dernière solution est débarrassé du reste de ses impuretés au moyen de l'analyse capillaire.

Wrede et Hettche (76) ont réussi les premiers à faire cristalliser la prodigiosine, ils ont constaté que son pouvoir tinctorial était très élevé et que les travaux antérieurs faits avec cette matière colorante étaient exécutés avec des solutions renfermant environ 2 $^{0}/_{00}$ de pigment. Ils ajoutent que, en ce qui concerne les propriétés chimiques établies jusqu'ici, ils ont pu confirmer : la solubilité dans les liquides lipoïdiques, la non-solubilité dans l'eau, le changement de coloration du jaune au rouge lorsqu'on acidifie une solution neutre ou alcaline du pigment. Ils n'ont par contre pas réussi à obtenir, à partir de la prodigiosine, la paraprodigiosine qui doit prendre naissance en ajoutant des alcalis faibles comme le mentionne E. Kraft (75) dans son travail.

Wrede et Hettche ont essayé d'abord de cultiver le Bacille sur des milieux liquides; les résultats ne furent pas satisfaisants. Ils ont eu plus de succès avec un milieu composé d'agar, de peptone, d'extrait de viande, de glucose et de sulfate de magnésie. Les cultures sont placées à la température de + 25°; après 4 à 5 jours, on remarque la formation d'une pellicule rouge sang. Ils ont obtenu avec 1 mètre carré de culture environ 150 mg. de pigment pur.

Comme la prodigiosine est enfermée dans les corps bactériens, ils l'ont traitée d'abord par une solution diluée de soude caustique pour détruire ces derniers. L'extraction se fait ensuite avec l'éther de pétrole à partir duquel il est possible de précipiter le pigment sous forme de chlorhydrate en faisant passer dans la solution un courant gazeux et sec d'acide chlorhydrique. Le résidu est purifié par dissolution dans l'alcool et précipité une deuxième fois par addition d'acide perchlorique à 5 %. Le perchlorate formé se présente alors sous l'aspect d'aiguilles pouvant atteindre plusieurs millimètres de longueur. Ces dernières ont leur point de fusion à + 228°. Elles sont insolubles dans l'eau, assez solubles dans l'alcool et le chloroforme, peu solubles dans l'éther et le benzol.

Ces auteurs ont ensuite régénéré la prodigiosine au moyen d'une solution à 10 % de soude caustique. A l'état libre, la substance colorante se présente sous forme de plaquettes amorphes, qui, comme la fuchsine, ont un aspect métallique verdâtre. Elle est alors insoluble dans l'eau, assez soluble dans l'alcool et dans l'éther, facilement soluble dans le chloroforme, le bromoforme et le benzol. Wrede et Hettche ont encore préparé à partir de la base purifiée et libérée des cendres une série de sels bien cristallisés, comme le picrate, le salicylate, le benzoate. A noter ici que le sel obtenu à partir de l'acide tartrique se distingue des autres par une solubilité partielle dans l'eau.

L'analyse de la substance a permis d'établir la formule C^{20} H^{25} N^{3} O-Ac (Ac = acide monobasique).

Le professeur Formanek à Prague, sur la demande de Wrede et Hettche, en a fait l'examen spectroscopique et tels sont les résultats obtenus :

Le perchlorate se dissout dans l'alcool sans fluorescence avec une coloration rouge si intense, que des traces de la substance suffisent déjà pour obtenir un spectre d'absorption. Celui-ci se compose de deux bandes assez étroites, dont la première paraît plus forte. La bande principale correspond à 5375 Å, l'autre à 5010 Å. Si l'on ajoute 3 gouttes de solution alcoolique d'acide chlorhydrique, la coloration de la solution du pigment ne change pas. Les bandes sont déviées à 5355 Å et 4985 Å.

La solution dans le xylol montre une bande principale à 5415 Å et une deuxième bande à 5050 Å.

En solution tétrachlorique nous avons une bande à 5430 Å et l'autre à 5055 Å.

Le professeur FORMANEK ajoute que, dans la substance, il n'y a pas trace d'un dérivé rosanilique. Il s'agit très probablement d'une nouvelle matière colorante qui, comme la pyocyanine, n'entre dans aucun des groupes connus jusqu'ici.

Nous insistons encore sur les recherches de LASSEUR et GIRARDET sur le spectre d'absorption de la prodigiosine, qui est sécrétée probablement par les deux formes bactériennes : *Bacillus prodigiosus* et *Bacillus Kiliensis*. « Dans la région visible, le spectre d'absorption du pigment du *Bacillus prodigiosus* est rigoureusement identique à celui de la matière colorante du *Bacillus Kiliensis*. »

Les solutions ont été effectuées avec de l'alcool à 85°. L'addition de petites quantités d'eau rend les bandes d'absorption plus nettes.

Avec les solutions concentrées, on observe une large bande d'absorption qui se divise en 3 bandes si l'on dilue la solution primitive.

« La troisième bande, ajoutent LASSEUR et GIRARDET, est faible; elle est floue, nébuleuse, à bords imprécis. Elle a d'abord passé inaperçue au spectroscope d'HILGER, mais elle a été observée à *Mulhouse* par M. G. GROSS, qui nous en a signalé l'existence. Par la suite, en nous plaçant dans des conditions propices, nous avons pu percevoir et photographier cette bande. Mais, même dans les cas favorables à son examen, on doit se limiter à déterminer son maximum d'absorption. Les bords de la bande n'offrent pas une netteté suffisante pour permettre l'établissement des courbes de HARTLEY. » Si l'on ajoute de l'ammoniaque, la solution de prodigiosine vire au jaune, le spectre change d'aspect : La bande I diminue considérablement d'intensité. La bande II augmente d'épaisseur et peut devenir bien plus intense que la bande I pour une épaisseur de 45 mm. de la couche liquide.

Nous donnons maintenant dans un petit tableau de comparaison les bandes des spectres d'absorption de la *prodigiosine*, de *l'oxychlororaphine* et du *pigment violet*.

Prodigiosine :

1re	Bande λ =	537,6	Bande noire
2e	Bande λ =	498	Bande grise
3e	Bande λ =	456 (?)	Bande très faible

Oxychlororaphine réduite :

1re	Bande λ =	704,8
2e	Bande λ =	637,6
3e	Bande λ =	587
4e	Bande λ =	537,4

Pigment violet (solution bleue) :

1re	Bande λ =	704,8
2e	Bande λ =	637,5
3e	Bande λ =	586,8

Si nous comparons ces trois spectres d'absorption, nous devons constater comme l'ont déjà fait Lasseur et Girardet que :

1° La prodigiosine et l'oxychlororaphine réduite ont une bande commune;

2° Que l'oxychlororaphine réduite et le pigment violet ont 3 bandes communes.

De plus, si l'on jette un regard sur les formules, nous voyons :

Oxychlororaphine = C^{14} H^{11} N^3O

Prodigiosine = C^{20} H^{25} N^3O

La prodigiosine pourrait bien être un homologue supérieur de l'oxychlororaphine, comme l'a déjà fait remarquer Sevenet (66) dans sa thèse et alors nous pourrions rapprocher les pigments du *B. chlororaphis*, *B. violaceus* et *B. prodigiosus*.

La formule développée de la prodigiosine n'a pas encore été publiée.

Nous pensons avoir dit l'essentiel sur les principaux pigments microbiens étudiés jusqu'à ce jour. Nous allons aborder maintenant la seconde partie, où il est question de nos recherches personnelles. Nous regrettons beaucoup de n'avoir pas pu pousser aussi loin que nous le désirions l'étude du pigment. Mais comme les cultures se développent très lentement, il faut beaucoup de temps pour obtenir une quantité suffisante permettant d'effectuer cette étude.

Nous nous réservons cependant de poursuivre ces recherches, lorsque nous aurons le matériel nécessaire.

DEUXIÈME PARTIE

Recherches personnelles

Avant de décrire notre Actinomyces, nous nous permettons de rappeler la première observation d'*oosporose pulmonaire* donnée par ROGER, SARTORY et BORY (43) en 1909, d'autant plus qu'elle possède une certaine analogie avec notre cas personnel.

Le 10 novembre 1908 entrait à l'hôpital de la *Charité* à *Paris*, dans le service du professeur ROGER, un homme de 35 ans qui se plaignait de toux et d'essoufflements. Le 2 décembre, la toux et l'expectoration augmentent, le malade maigrit de telle sorte qu'en moins d'un mois il avait perdu 10 kg.

L'expectoration exhale une odeur putride, quelques crachats sont finement striés de sang.

La 15 décembre survient soudainement une crise de suffocation avec perte de connaissance. Un moment, la respiration est inégale et superficielle, les pulsations cardiaques sont extrêmement faibles et rapides. On fait une injection d'éther et de caféine. Le malade reprend connaissance. Mais cette accalmie est passagère. La mort survient quelques heures plus tard après une nouvelle crise analogue.

A l'autopsie on remarque, pour les poumons, l'aspect classique de la broncho-pneumonie pseudo-lobaire.

Le lobe inférieur est creusé de cavernules grosses comme une noisette et remplies par une matière blanchâtre renfermant de nombreux grains, qui, à la couleur près, ressemblent tout à fait à des grains actinomycosiques.

L'autopsie permet de conclure à l'absence de tuberculose et à l'existence d'une broncho-pneumonie à la base droite.

C'est en examinant les pièces anatomiques que ROGER, SARTORY et BORY eurent l'idée qu'il s'agissait d'une affection mycosique.

L'examen microscopique des exsudats montra, en effet, l'existence de filaments longs et minces non acido-résistants, mais se colorant par la méthode de GRAM.

L'examen histologique confirmait la nature mycosique du processus.

Après avoir démontré expérimentalement l'effet pathogène du champignon en l'injectant à des lapins et à des cobayes, ROGER, SARTORY et BORY lui donnèrent le nom d'*Oospora pulmonalis*.

Nous ne nous étendrons pas ici sur l'étude morphologique et biologique de l'*Oospora* en question; nous nous réservons de résumer ses caractères et ses propriétés dans un tableau de comparaison avec l'*Actinomyces* que nous avons étudié.

CHAPITRE PREMIER

Étude morphologique et biologique de l'Actinomyces pulmonalis var. gracilis

Ses caractères culturaux sur les différents milieux

1° *Observation.*

La malade (1) est une religieuse âgée de 56 ans, qui tousse depuis des années. Elle expectore plusieurs fois par an des crachats sanguinolents, qu'elle prend pour des morceaux de poumon. On note une toux opiniâtre; son affection est considérée comme une bronchite invétérée; on la traite pour tuberculose pulmonaire.

2° *Examen microscopique des expectorations.*

Dans les parties sanguinolentes des crachats nous avons fait les prélèvements, qui ont été étalés sur une lame de verre, fixés par la chaleur en évitant une dessiccation trop énergique et colorés tout d'abord selon la technique indiquée par SARTORY (77).

1° Fixer à la chaleur 3 à 5 fois.

2° Colorer par le ZIEHL à chaud, jusqu'à émission de vapeurs, 3 à 4 minutes.

3° Laver à l'eau.

4° Colorer par le *Kristall violet* phéniqué 4 à 5 minutes.

5° Faire agir la solution de LUGOL.

6° Décolorer à froid par l'alcool acétone.

7° Laver à l'eau.

8° Colorer au bleu de méthylène pendant 1 minute.

9° Laver à l'eau, sécher, examiner.

(1) Nous tenons à exprimer ici nos plus vifs remerciements à Mademoiselle le Docteur *Zimmer*, Médecin de *l'Hospice Stéphanie de Strasbourg*, qui a bien voulu nous communiquer l'observation de la malade et le matériel qui nous a permis de faire l'étude de ce cas.

Une observation très minutieuse des différentes lames ne nous a jamais permis d'apercevoir des éléments acido-résistants.

Par contre, nous notons de nombreux petits filaments mycéliens courts, de calibre régulier (environ 0,35 μ), présentant parfois de légères ramifications; dans certains cas ces ramifications sont assez développées; on en compte çà et là deux à chaque extrémité des filaments. En outre, on peut observer des formes en spirilles et en tortillons. On remarque aussi des rameaux, qui donnent naissance à des files d'arthrospores de 0,6 μ de diamètre; leur nombre est variable. On note encore la présence d'éléments cocciformes isolés, formant parfois de petites colonies ou disposés en chaînettes (Pl. I).

Remarquons ici que l'on pourrait confondre ces éléments avec une association de formes bacillaires et de streptocoques; d'autant plus qu'en certains points, les filaments se segmentent pour donner naissance à des bâtonnets droits. Mais un examen attentif et approfondi permet, étant donnés la forme, la grandeur, la façon dont les éléments se divisent, l'aspect particulier des chaînettes, de constater que nous avons bien affaire à des arthrospores, et à des segmentations de filaments mycéliens.

Nous nous en voudrions de ne pas insister une fois de plus ici sur l'importance de l'étude des *Actinomyces*, étant données les affinités cliniques entre la tuberculose et l'actinomycose, et la facilité avec laquelle on peut confondre les agents infectieux de ces deux maladies, surtout lorsque l'analyse révèle des éléments acido-résistants ou granuleux.

Si l'on pense à la fréquence des cas, je peux souligner que dans le courant de l'année, à côté de mon travail, à plusieurs reprises, j'ai pu constater dans des prélèvements pathologiques, examinés au laboratoire de mon cher maître, des exsudats, des expectorations, la présence d'*Actinomyces*. Si l'on songe aussi à l'importance de l'analyse pour le diagnostic du médecin et pour la guérison du malade, car le *bacille tuberculeux* est difficile à détruire, tandis que les lésions produites par les *Actinomyces*, soit internes, soit externes sont combattues efficacement par le traitement ioduré, on

comprendra mieux encore la nécessité d'une connaissance solide et approfondie de ces parasites. Nous attirons aussi l'attention sur la confusion possible à l'examen direct entre les chaînettes d'arthrospores et les Streptocoques, surtout pour un observateur non initié.

3° *Isolement.*

Nous avons pu obtenir notre champignon à l'état de pureté par des ensemencements successifs sur milieu de SABOURAUD maltosé. Après quelques repiquages déjà, le parasite se développait, débarrassé de tous les éléments étrangers. Les cultures étant peu résistantes au début, nous les avons réensemencées toutes les semaines.

4° *Cultures en goutte pendante.*

Pour avoir une idée très exacte de la morphologie de l'*Actinomyces* en question, nous avons suivi tous les jours son évolution dans des cultures effectuées dans des boîtes de BORREL.

Ces dernières consistent en de petites fioles cylindriques, en verre, munies d'un ajutage latéral. Une des faces est ouverte. On la recouvre d'une lamelle très fine qu'on fixe par de l'albumine d'œuf ou plus facilement par de la colle forte. L'ajutage est bouché avec du coton et recouvert d'une bague en caoutchouc. Le tout est stérilisé à l'étuve à + 160° pendant une heure.

Après la stérilisation, la fixation de la lamelle est assurée extérieurement par de la cire à cacheter. Nous introduisons alors, selon toutes les règles de l'asepsie la plus rigoureuse, une goutte de SABOURAUD maltosé sur la lamelle et une goutte d'eau à la partie supérieure pour maintenir un degré suffisant d'humidité dans l'atmosphère du récipient. Il ne reste plus alors qu'à ensemencer et à suivre le développement sous le microscope en portant la lamelle sous l'objectif. Entre les observations nous avons placé nos cultures à la température optima, c'est-à-dire à + 27°.

Cependant pour suivre avec évidence la division de certains filaments, la formation d'arthrospores etc. nous

avons constamment laissé sous le microscope, la partie qui nous intéressait.

Ajoutons aussi, que de temps en temps, nous avons introduit sur la lamelle de la boîte de BORREL une goutte de bouillon nutritif.

Nous pouvons résumer ainsi le fruit de nos examens.

Après quelques jours de culture, les filaments mycéliens, alors très petits, s'allongent. Ils sont en général droits, immobiles, non enchevêtrés. Au bout de 6 à 8 jours cela devient plus intéressant : des ramifications se forment à des distances inégales. Des colorations effectuées en même temps sur des cultures aussi âgées, au moyen du bleu de méthylène très dilué, nous ont permis d'apercevoir aux endroits où allaient naître des ramifications, ainsi qu'aux extrémités des filaments, des places très réfringentes. Ce qui expliquerait très bien une concentration de protoplasma exigé par les parties qui vont se développer.

Nous avons alors effectué les mesures des éléments. Ici, un détail nous a frappé. Les filaments mycéliens n'avaient pas tous la même largeur. Chez les uns cette dimension était comprise entre 0,3 μ et 0,4 μ ; chez les autres, entre 0,6 μ et 0,7 μ. La longueur très inégale, oscillait entre quelques μ et 0,5 mm.

Des cultures plus âgées nous ont permis alors de constater que les filaments les plus minces, par suite d'appauvrissement en protoplasme provoquaient un fractionnement donnant naissance à des éléments plus longs que larges, qu'on pouvait confondre parfois avec des bactéries. Quant aux parties les plus larges, elles peuvent produire aussi des arthrospores.

On trouvait déjà là l'explication logique des formes observées dans les frottis exécutés à partir des expectorations de la malade.

Dans la suite, nous notons l'apparition d'éléments d'aspect très différent : formes arrondies, pectinées, en tortillons. Nous apercevons également des formes en massue, produites par un filament qui, après un allongement réduit,

se renfle à son extrémité. Parfois les massues adhèrent encore à la tige mère, d'autres fois elles en sont séparées (Fig. 2).

A l'extrémité de certains filaments nous avons pu suivre la formation de spores, du reste très fragiles, et qui se détachent facilement. On les retrouve alors soit isolées, soit en colonies, soit en chaînettes.

Enfin dans les cultures les plus vieilles, on remarque la prédominance des éléments bacilliformes, des renflements en massue et la rareté des ramifications.

Nous reproduisons aussi exactement que possible dans la planche 1 les formes observées durant tout le cours de nos examens.

5° *Colorations vitales et frottis.*

Alors que d'une part, nous suivions notre organisme en détail dans les cultures en goutte pendante, nous avons toujours contrôlé les faits constatés au moyen de colorations les plus diverses. Les préparations à partir de cellules vivantes effectuées avec le Sudan III ont montré une membrane et un protoplasma difficilement colorables par notre technique.

Pour fixer les frottis nous avons eu recours à plusieurs méthodes :

1° Chaleur.

2° L'alcool méthylique versé sur les préparations et séché à l'air.

3° L'alcool à 96° ou l'alcool éther.

Le champignon ainsi fixé se colore facilement par les colorants basiques d'aniline.

La méthode de Gram, employée de la façon suivante, nous a donné constamment des résultats positifs : on laisse agir le violet de gentiane phéniquée une minute et demie, on enlève l'excès de matière colorante et on mordance par le liquide de Lugol trente secondes à une minute. On lave à l'eau, on décolore par l'alcool 20 à 30 secondes, on lave à l'eau et on colore par la solution d'éosine 2 minutes. Après un dernier lavage à l'eau, on sèche et on examine.

Pour mettre en évidence les spores nous avons eu recours à la méthode de SCHUMACHER (78).

1° Fixer la préparation par la chaleur.

2° Colorer une minute avec une solution phéniquée à 1 % de bleu de méthylène.

3° Laver à l'eau distillée.

4° Colorer pendant 1 minute et demie en agitant constamment au moyen d'une solution fraîche à 1 % de phosphine (di-amido-phényl-acridine).

Les éléments acido-résistants sont colorés par cette méthode en vert, la nucléine en jaune et les spores en bleu.

Simultanément nous avons fait usage, pour rechercher la présence des spores, de la méthode de MŒLLER.

1° Mettre les frottis fixés pendant deux minutes dans le chloroforme.

2° Laver à l'eau.

3° Placer pendant 3 minutes dans une solution à 5 % d'acide chromique.

4° Laver à l'eau.

5° Colorer par la fuchsine phéniquée en chauffant pendant 1 minute au moins jusqu'à émission de vapeurs.

6° Rejeter le colorant et placer le frottis pendant 5 secondes dans une solution à 5 % d'acide sulfurique.

7° Laver à l'eau.

8° Contrecolorer pendant 30 secondes au moyen d'une solution de bleu de méthylène aqueuse diluée.

9° Laver à l'eau, sécher, examiner à l'huile de cèdre.

Les colorations obtenues par ces deux dernières méthodes ont été tout à fait satisfaisantes et concordantes. Les essais continuels avec le ZIEHL-NEELSEN n'ont jamais permis de découvrir des éléments acido-résistants.

Enfin pour déceler les granulations nous avons eu recours au procédé recommandé tout particulièrement par SARTORY et déjà cité au début de ce travail.

6° *Caractères culturaux.*

Le parasite étudié ne croît pas facilement et dans les premiers temps nombreuses ont été les difficultés devant lesquelles nous nous sommes trouvé pour entretenir l'espèce.

Les ensemencements ont été pratiqués sur les milieux les plus divers, solides et liquides, à différents pH, en aérobiose et en anaérobiose.

Disons-le tout de suite, l'*Actinomyces* a beaucoup de peine à s'adapter aux milieux nutritifs solides.

Ainsi nous n'avons observé aucun développement sur milieu de RAULIN acide et neutre solidifiés par la gélose; sur pomme de terre acide, sur pomme de terre glycérinée, sur moût de bière, sur carotte simple ou macérée au préalable dans une solution de maltose ou de glucose, sur banane, topinambour, jus de pomme de terre alcalin solidifié.

Cependant nous avons pu observer, après une semaine de culture, quelques colonies grisâtres, fragiles sur SABOURAUD maltosé solidifié. Le développement est extrêmement lent et malgré des repiquages successifs sur de nouveaux milieux solides, nous n'avons pas réussi à conserver l'espèce sur ces substrats solides.

L'examen microscopique des colonies révèle la prédominance de filaments courts, non ramifiés, de forme bacillaire, dont quelques-uns sont terminés en massue.

Tous ces éléments sont GRAM positifs, mais ne se colorent pas par la méthode de ZIEHL.

La poussée du champignon sur milieux minéraux divers solidifiés par la gélose n'a pas eu plus de succès.

Pour terminer nous avons pensé avoir recours à un mélange de sels minéraux et de substances organiques. Nous avons fait nos cultures sur le milieu suivant :

Chlorure de sodium	0,5 gr.
Sulfate de magnésie	2,5 gr.
Phosphate de sodium	5,0 gr.
Sulfate de fer	traces
Glycérine	5,0 gr.

Eau distillée	1000,0 gr.
Extrait de Liebig	5,0 gr.
Jaunes d'œuf.....	V
Beurre	10,0 gr.

Une fois de plus nous devons constater que les résultats sont peu satisfaisants aussi bien avec les milieux solides spéciaux qu'avec les milieux usuels. Les meilleurs résultats ont été réalisés par ensemencements alternatifs sur milieu de SABOURAUD maltosé liquide et milieu solide.

Les cultures effectuées à partir des milieux liquides suivants : liquide de RAULIN acide et neutre, jus de pomme de terre alcalin, bouillon glycériné, eau de malt, moût de bière n'ont donné lieu à aucun développement.

Nous avons obtenu une poussée de l'*Actinomyces* sur bouillon peptoné.

Mais le milieu de choix est le SABOURAUD maltosé neutre, préparé avec la maltose brute.

Culture sur bouillon peptoné à 3 % : L'organisme croît très lentement à la température optima. Au bout de 10 jours, il donne un petit dépôt brun filamenteux dans le tube, le bouillon reste clair. Nous n'avons jamais remarqué de voile à la surface du liquide. Le dépôt jusqu'alors très peu important augmente de volume pour atteindre un maximum après trois semaines de culture.

Nous observons à l'examen microscopique les formes les plus diverses : filaments mycéliens droits et recourbés, en général peu ramifiés, nous notons aussi la présence d'éléments pectinés ou en tortillons, assez rarement nous avons trouvé des filaments renflés en massue. On peut aussi noter des files d'arthrospores. Toutes ces formes sont GRAM positives, non acido-résistantes.

Culture sur SABOURAUD maltosé : Le développement est ici plus rapide. Après 5 jours déjà, on aperçoit au fond du tube, un dépôt constitué par de petits bâtonnets de longueur inégale, non enchevêtrés et non ramifiés. La culture continue à évoluer assez rapidement sans que le milieu se trouble. Si l'on agite alors le tube, le dépôt se détache et se disperse en particules très fines.

Au bout de quinze jours, on observe à l'extrémité de certains rameaux des spores de 0,6 μ de diamètre en nombre variable. Ces dernières sont colorables par la méthode de MŒLLER et de SCHUMACHER.

Après trois semaines, le dépôt a alors la grosseur d'une noisette; mais la croissance de notre organisme semble arrêtée.

Une série de colorations par la méthode de GRAM et par le bleu de méthylène très dilué a permis de retrouver les différents éléments qui résument très bien les caractères botaniques de notre organisme.

1° Filaments mycéliens immobiles, non enchevêtrés les uns dans les autres, de longueur pouvant atteindre 0,5 mm, de largeur égale à 0,3 μ — 0,4 μ, peu ramifiés. Les ramifications sont irrégulièrement distribuées et prennent naissance sur un filament principal.
2° Filaments mycéliens en train de se diviser en articles bacilliformes; parfois même les bâtonnets sont épars.
3° Formes très diverses, arrondies, en spirilles, en tortillons.
4° Spores en nombre de 2 à 6 à l'extrémité des rameaux.
5° Files d'arthrospores séparées des rameaux.
6° Renflements en massue.

Tous ces éléments sont GRAM positifs et non acido-résistants.

Propriétés biologiques

Optimum cultural.

Les tubes de SABOURAUD maltosé ensemencés sont placés aux températures suivantes : 0°, + 4°, + 12°, + 18°, + 27°, + 32°, + 37°, + 42°, + 55°.

On note l'absence complète de développement à 0°, + 4°, + 12°, + 42°, + 55°. A + 18° et + 37° les cultures ne sont pas très luxuriantes. La meilleure croissance a été obtenue aux températures de + 27° et + 32°, qui représentent donc l'optimum cultural.

Nous avons choisi la température de + 27° pour les expériences que nous avons effectuées.

Etude de la concentration optima en ions H.

Nous nous sommes servis pour effectuer les mesures ionométriques du potentiomètre à électrode à antimoine (Vlès-Gex). Nous avons employé comme milieu de culture le bouillon peptoné.

Dans une série de tubes nous avons fait varier la concentration en ions H depuis le pH = 3 au pH = 9.

Nous avons pu constater que pour un pH inférieur à 6 et supérieur à 7,5 nous n'avons plus eu de poussée du champignon.

Le maximum de récolte en 8 jours a lieu pour un pH = 6,9 qui représente ainsi la concentration optima en ions H.

Aérobiose et anaérobiose.

Sur milieux solides et liquides les cultures placées dans la cloche à vide à 70 mm n'ont pas donné de bons résultats.

Nous pensons donc que notre organisme a besoin pour se développer d'une atmosphère d'oxygène à pression réduite.

Influence de la lumière :

La lumière n'a pour ainsi dire aucune action sur notre champignon, qui s'est développé aussi bien en lumière diffuse que dans les tubes enveloppés de papier noir.

CHAPITRE II

Propriétés biochimiques et protéolytiques

1° *Cultures sur milieux minéraux.*

a) Action sur les nitrates : Pour étudier l'action de notre parasite sur les nitrates et leur réduction éventuelle en nitrites, ou pour voir s'il possédait les propriétés d'un ferment dénitrifiant en décomposant le nitrite avec dégagement d'azote, nous avons préparé le milieu suivant :

Glucose	2,0 gr.
Nitrate de potassium	1,0 gr.
Eau distillée	100,0 gr.

Nous avons ensemencé plusieurs tubes. Le développement se fait lentement; en aucun cas nous n'avons pu constater un dégagement gazeux.

De même la recherche dans les solutions des nitrites au moyen de la métaphénylène-diamine est restée négative.

b) Action sur un milieu synthétique minéral contenant un sel ammoniacal : Nous ensemençons plusieurs tubes sur le milieu suivant :

Chlorure d'ammonium	2,0 gr.
Sulfate de magnésie	5,0 gr.
Phosphate de potassium	1,0 gr.
Sulfate d'ammonium	2,0 gr.
Glycérine	2,0 gr.
Eau distillée	1000,0 gr.

Après 3 semaines à 27°, nous n'avons pu constater de dépôt notable au fond du tube, ni la formation d'un voile à la surface. La solution reste claire.

Par conséquent, le milieu ammoniacal n'est pas plus favorable à notre organisme que le milieu nitraté.

2° *Action sur les sucres.*

Avant de décrire nos expériences personnelles, nous tenons à donner un bref aperçu des principales recherches effectuées sur les ferments qui ont retenu notre attention.

a) Zymase alcoolique : Cette enzyme a été mise plusieurs fois en évidence par Roger, Sartory, Bory, Lasseur, Bailly lorsqu'ils ont étudié les caractères de fermentation de quelques *Oospora* pathogènes : *O. pulmonalis* (43) ; *O. buccalis* (79) ; *O. bronchialis* (48) ; *O. acido-résistant* (50) ; et *O. catarrhalis* (44).

b) Amylase : Elle a été observée chez une série d'espèces comme le décrivent, entre autres, Lieske (80), Sames (81), Caminiti (82), Krainsky (83) dans leurs études sur ces microorganismes. La plus grande partie des *Actinomyces*, qui entrent dans la sous-section des Majores, ont la propriété de liquéfier l'amidon.

c) Lipase : Ce ferment qui transforme les graisses en glycérine et en acides gras a fait l'objet de nombreuses recherches. Lieske (80) par exemple, dans ses généralités sur les *Actinomyces* cite comment Jensen (84) découvre une lipase chez l'*Actinomyces chromogenes* en faisant ses essais sur du beurre stérile.

d) Les ferments protéolytiques, que les champignons sécrètent pour dissoudre la gélatine, l'albumine, le sérum coagulé, se retrouvent chez un grand nombre d'espèces et servent à leur classification : ainsi pour l'*A. violaceus*, l'*A. Rivieri*, l'*A. lingualis*, l'*A. liquéfaciens*, etc.

e) Présure et caséase : Ces ferments qui font coaguler le lait et dissolvent la caséine précipitée, ont aussi été observés chez les *Actinomyces*, par exemple chez l'*A. albus*, l'*A. Rivieri*, l'*A. albidoflavus*, l'*A. albus acidus*, etc.

Nous commencerons notre étude par la recherche de la zymase alcoolique à laquelle nous avons consacré tous nos soins.

Nous nous sommes adressés en ce qui concerne le milieu de culture à l'eau peptonée à 3 %.

Après neutralisation, nous l'avons répartie dans des tubes, de manière que chacun contienne 9 cm^3. Ces derniers sont stérilisés pendant 20 minutes à 120°.

En outre nous avons préparé les solutions de sucre à 3 % pour le glucose, lévulose et galactose, et à 5 % pour les bioses : saccharose, maltose, et lactose. Le tout est stérilisé par tyndallisation à + 80° pour éviter l'altération et l'inversion de certains sucres.

Avec des pipettes stériles et en suivant toutes les règles de l'asepsie la plus rigoureuse, nous avons ajouté à l'eau peptonée 6 cm^3 de la solution des différents sucres, de manière à avoir pour chaque hydrate de carbone du groupe des monoses 8 tubes et pour chaque représentant des bioses 16 tubes.

A noter ici que pour la maltose et le glucose, les expériences ont été faites avec la substance soit chimiquement pure soit brute. Nous devons faire remarquer que la culture était plus luxuriante avec les sucres bruts.

Nous avons ensuite procédé aux ensemencements et placé les cultures à la température de + 27°.

Nous pouvons affirmer que toutes nos expériences ont été rigoureusement contrôlées par un dosage fait en même temps par comparaison avec des solutions témoins stériles placées dans les mêmes conditions.

Les dosages sont effectués après 4 jours, 12 jours, et un mois, en suivant la méthode de BERTRAND (85) de la manière suivante :

La culture est versée dans un ballon jaugé de 100 cc. et complétée au volume avec de l'eau distillée. Ce faisant, nous éliminons ainsi une cause d'erreur provenant de l'évaporation des solutions pendant les opérations préliminaires.

Ensuite nous prélevons 10 cc. dans une fiole d'ERLENMEYER, ajoutons 10 cc. d'eau, 20 cc. de liqueur cuivrique, 20 cc. de liqueur sodique. On chauffe à l'ébullition exactement 3 minutes et on laisse déposer le précipité. On passe à la trompe le liquide surnageant sur un filtre d'Iéna, on lave rapidement et on verse les eaux bleues.

On dissout le précipité d'oxydule de cuivre dans 20 cc. de solution ferrique, on filtre et après lavage on titre par le permanganate de potassium jusqu'à coloration rose persistant 1/4 de minute.

Pour les hydrates de carbone en C12, sachant qu'ils se dédoublent sous l'influence des agents hydrolytiques en 2 molécules de sucre à 6 atomes de carbone, nous avons chaque fois fait le dosage avant et après interversion.

Pour résumer les résultats des expériences, nous dirons qu'après 4 jours de culture nous n'avons pu constater aucune assimilation des hydrates de carbone par notre organisme.

Les tubes témoins et la culture ont exigé exactement le même nombre de cc. de solution de permanganate pour régénérer le sel ferrique et nous avons également retrouvé la quantité totale de sucre non attaqué soit 3 % et respectivement 5 % pour les bioses.

Les dosages effectués après 12 jours et 1 mois ont prouvé que notre *Actinomyces*, en présence de substance quaternaire n'attaque aucunement le glucose, le lévulose, le galactose, le saccharose et le lactose.

Par contre, nous avons pu noter une très faible assimilation de la maltose qui constituerait ainsi un élément nutritif très médiocre.

Nous nous croyons donc en droit de conclure :

1° Que les milieux à base d'hydrate de carbone sont de très mauvais aliments pour notre organisme;

2° Que les caractères de fermentation n'ont en aucun cas pu être établis; par le fait même que nous avons constaté l'absence de zymase alcoolique.

3° *Action sur l'amidon.*

Des cultures effectuées sur la gelée d'amidon de consistance demi-solide n'ont pas poussé. L'amidon ne s'est pas désagrégé, ni liquéfié, ce qui prouve donc l'absence d'amylase chez notre champignon.

4° *Action sur le rouge neutre.*

Notre organisme est ensemencé sur le milieu suivant :

Peptone	20,0 gr.
Glucose	2,0 gr.
Chlorure de sodium	5,0 gr.

Extrait de Liebig	5,0 gr.
Glycérine	5,0 gr.
Solut. aqueuse de rouge neutre à 1 %	3 cc.
Eau distillée	1000,0 cc.

L'introduction de petites quantités de sucre est destinée à favoriser la réduction.

Pour cette opération nous nous sommes servis d'éprouvettes larges dans lesquelles nous avons introduit un tube à hémolyse renversé, entièrement baigné par le milieu.

Ces opérations ont été effectuées en présence d'un tube témoin et observées pendant trois semaines.

Nous n'avons pas remarqué de changement de coloration, de fluorescence ni de dégagement gazeux.

Nous pouvons donc affirmer que l'*Actinomyces* étudié :

1° ne réduit pas le rouge neutre;
2° ne produit pas de gaz en présence de glucose;
3° ne provoque ni alcalinisation, ni acidification du milieu.

5° *Recherche de l'indol :*

A cet effet, nous nous sommes adressé au milieu suivant :

Peptone	5,0 gr.
Chlorure de sodium.....	1,0 gr.
Eau distillée	1000,0 gr.

La solution est ajustée à un pH = 6,9 et répartie dans des tubes. Après stérilisation pendant 20 minutes à + 120°, nous avons ensemencé deux tubes avec notre organisme, deux autres tubes contenant un milieu identique ont servi de témoin.

Nous avons laissé la culture 20 jours à l'étuve à la température optima, puis nous avons prélevé à l'aide d'une pipette stérilisée 10 cc. de cette dernière, ajouté 1 cc. d'une solution de nitrite de potassium à 1 °/₀₀. Après avoir agité, nous l'avons additionnée d'une dizaine de gouttes d'acide sulfurique pur et concentré que nous avons laissé couler avec précaution le long du verre. Nous avons constaté alors l'absence de coloration rouge. Nous avons ensuite introduit

2 cc. d'alcool amylique, agité, laissé reposer. La couche alcoolique est restée incolore.

Les essais répétés une deuxième fois ont donné les mêmes résultats que ceux exécutés avec le milieu témoin.

Nous pouvons donc conclure à l'absence d'indol.

6° *Action sur le lait tournesolé.*

Ecrémé par centrifugation, puis alcalinisé légèrement par quelques gouttes de solution de carbonate de soude à 1 pour 10 jusqu'à ce qu'il bleuisse légèrement le papier de tournesol, le lait est stérilisé par trois chauffages successifs à + 100° de 30 minutes chacun à 24 heures d'intervalle.

Après stérilisation on ajoute avec une pipette stérile de la teinture de tournesol stérile en quantité suffisante pour obtenir une teinte violette. On ensemence alors et place à l'étuve à + 27°.

Le lait conserve sa coloration et ne se coagule pas.

Nous constatons ainsi l'absence de présure et de caséase dans notre organisme.

7° *Action sur le sérum coagulé.*

Le sérum coagulé n'est pas un milieu nutritif favorable à la croissance de notre *Actinomyces*. Après 3 semaines de culture à la température de + 27° nous n'avons constaté aucune colonie et aucun phénomène de liquéfaction.

8° *Action sur la gélatine.*

Nous avons eu recours au bouillon peptoné, dans lequel nous avons dissous 10 % de gélatine extra fine. Nous avons ensemencé en piqûre et en surface sur tubes inclinés et laissé les milieux de culture à une température de + 20°.

La gélatine reste indemne, à aucun moment nous n'avons pu apercevoir même un commencement de liquéfaction.

9° *Action sur le blanc d'œuf.*

Sur de petits cubes de blanc d'œuf coagulé par la chaleur et stérilisé, introduits dans des tubes à essai et recouverts d'une solution de peptone à 3 %, nous ensemençons notre champignon et plaçons les tubes à la température optima.

Nous n'avons jamais pu constater une dissolution ou attaque du blanc d'œuf.

CHAPITRE III

I. Action pathogène expérimentale

Au moyen d'une émulsion de 4 öses de culture dans 8 cc. de sérum physiologique, nous avons inoculé 3 cobayes : l'un par voie intrapéritonéale (2 cc.) ; l'autre par voie intracardiaque (1 cc.) ; le troisième par voie sous-cutanée (4 cc.).

Première expérience : L'animal inoculé par voie intrapéritonéale pesait 320 gr. Après avoir diminué constamment et régulièrement de poids, il a succombé après 9 jours. A l'autopsie nous constatons les faits suivants :

Le système ganglionnaire est peu hypertrophié. Les poumons sont légèrement congestionnés. Par contre le foie est très hypertrophié, tandis que la rate a conservé sa grandeur normale. Le pancréas est aussi hypertrophié et parsemé de points blancs. On note encore dans ce dernier de petites hémorragies. Le reste du tube digestif est normal. Les glandes surrénales ont augmenté de volume.

L'examen microscopique des prélèvements à partir des différents organes lésés révèle surtout la présence de filaments très courts, colorés par la méthode de GRAM, non acido-résistants et présentant des formes bacillaires en chaînettes.

Des ensemencements pratiqués sur milieu de SABOURAUD maltosé, à partir de prélèvements effectués dans les organes atteints, nous ont permis de reproduire en culture notre *Actinomyces*.

Examen hystologique : On a pratiqué des prélèvements du foie, de la rate, du poumon et d'un ganglion. Les particules coupées en petites tranches ont été placées dans le liquide fixateur de BOUIN. Après fixation et passages successifs à travers les alcools de différents degrés et du Toluène,

nous avons fait des inclusions en paraffine et effectué des coupes. Celles-ci ont été fixées sur des lames porte-objets et inclues dans du baume de Canada.

Les coupes histologiques ont été colorées par la méthode de coloration différentielle à l'hématoxyline-éosine-safran et par la méthode de GRAM.

On note à l'examen histologique une prolifération de l'endothélium des travées spléniques avec de nombreux petits follicules distribués çà et là dans la coupe. Chaque follicule est constitué par un centre rose homogène et autour de ce dernier on aperçoit de nombreux noyaux de cellules en voie de dégénérescence disposés en rosace radiaire. Ce centre est entouré d'une zone assez large de polynucléaires et de macrophages et tout autour on trouve une couronne de cellules réticulo-endothéliales proliférentes. Les cellules épithélioïdes plus ou moins allongées augmentent d'autant plus qu'on se rapproche de la périphérie du follicule, tandis que les leucocytes et les lymphocytes diminuent de plus en plus vers la périphérie.

Le foie est congestionné, parsemé de petits nodules, dont plusieurs paraissent typiquement de nature mycosique. Les autres follicules montrent les mêmes caractères que ceux de la rate. Leur nature mycosique est ici beaucoup plus évidente par suite de la constitution des microabcès avec un arrangement cellulaire concentrique en 3 zones nettement distinctes, inversement dirigées par rapport au tubercule type dû au bacille tuberculeux. Nulle part cependant il ne nous a été donné de mettre en évidence dans les coupes de ce cobaye une formation de grains actinomycosiques ou d'un mycélium typique.

Les poumons présentent une congestion avec œdème et alvéolite végétante, qui par endroit est très prononcée. Nulle part nous ne trouvons des nodules typiques actinomycosiques. On est frappé par le nombre important d'éléments inflammatoires (polynucléaires et lymphocytes), qui évoluent dans la trame des alvéoles pulmonaires.

Deuxième expérience : Le second cobaye inoculé par voie intracardiaque pesait 350 gr. Nous avons noté son poids tous

les deux jours : 330 gr., 325 gr., 310 gr., 305 gr., 295 gr. et 285 gr. Il est mort 15 jours après la piqûre.

A l'autopsie on constate une granulie du poumon droit avec adhérence de la plèvre et du péricarde; le lobe gauche du foie est très attaqué et une grosse caverne jaunâtre le transperce de part en part; adhérences du péritoine; le lobe droit du foie est farci de petits nodules. La rate est très hypertrophiée et lésée; ganglions mésentériques, brachiaux et inguinaux. Les reins sont normaux ainsi que l'estomac et l'intestin.

Dans l'urine nous constatons la présence d'albumine.

Dans toutes les lésions décrites nous avons retrouvé le parasite.

Etude histologique : Nous n'insistons pas ici sur les coupes effectuées au moyen du foie et de la rate, mais nous tenons à décrire l'aspect des foyers pulmonaires et en même temps nous donnons une description des lésions et de l'aspect des grains actinomycosiques trouvés dans le ganglion inguinal de notre troisième cobaye. Dans les poumons on note une forte infiltration et une prolifération intense du tissu conjonctif des interstices ou de l'épithélium alvéolaire. Les alvéoles avoisinantes, étant par ce processus comprimées ou remplies, occasionnent ainsi la formation de tubercules miliaires. Au centre de ces tubercules on trouve suivant l'évolution plus ou moins tardive, soit un petit grain actinomycosique de structure très fine en forme de rosace avec des massues facilement constatables; soit une agglomération de mycélium avec de nombreux filaments ramifiés et une zone périphérique de massues formant une sorte de bordure. Autour de ces éléments mycéliens on note 3 couches concentriques constituées de la façon suivante :

La plus interne est formée par des polynucléaires et des cellules migratrices, la moyenne est un tissu de granulation avec des fibroblastes anastomosés et des fibres collagènes minces. Les vaisseaux sanguins sont très nombreux et entourés d'un grand nombre de lymphocytes et de polynucléaires. La couche externe périphérique constitue une capsule de tissu conjonctif avec des fibres collagènes serrées. Çà et là, on rencontre des conglomérations de plusieurs

petits nodules, se réunissant pour donner un grain volumineux qui traverse les bronches.

Dans les ganglions du 3e cobaye on décèle de nombreux grains mûrs. Tandis que les plus jeunes grains avaient encore une forme arrondie, radiaire, les plus âgés présentaient l'aspect d'un cordon allongé et plus ou moins enroulé, souvent en croissant ou en Brettstel, tel que nous avons essayé de le retenir sur notre figure. (Fig. 3).

Ce cordon se compose d'un mycélium fortement enchevêtré, richement ramifié et englobant de nombreuses spores. A la partie extérieure, on trouve des filaments réunis en groupe, assez courts, ramifiés, disposés radiairement et se terminant par une extrémité légèrement hypertrophiée. Ces éléments s'accolent intimement aux massues qui entourent toute la partie convexe du cordon. A la partie concave et interne, on remarque des filaments nombreux, très longs et fins qui s'acheminent vers le centre de la cavité entourée par le cordon mycélien et qui souvent s'échappent par l'ouverture du croissant pour s'infiltrer dans le tissu cellulaire avoisinant. Le tout est entouré par de nombreux polynucléaires, par des cellules épithélioïdes et de rares cellules géantes. Pour l'examen microscopique de ces coupes nous avons employé la méthode de coloration de Schlegel : On place les coupes pendant 5 heures à + 37° dans une solution alcoolique d'éosine concentrée. On lave très peu dans de l'alcool à 96° et on colore pendant 10 minutes dans une solution d'hématéine. On lave rapidement à l'eau et on inclue. Les massues sont ainsi bien étalées et fortement colorées en rouge. Les éléments tissulaires sont bleus et bruns.

Troisième expérience : Nous avons inoculé un 3e cobaye pesant 380 gr. par voie sous-cutanée. Comme les deux précédents l'animal diminue constamment de poids. Après 30 jours, nous l'avons sacrifié en vue de prélever son sang pour l'étude de la fixation du complément.

A l'autopsie nous avons fait les constatations suivantes : foie hypertrophié et parsemé dans toute son étendue de petites cavernules brun-jaunâtres. La rate de volume à peu près normal était remplie de petits grains disposés en damier. Les bronches lobulaires n'offrent macroscopiquement rien

d'anormal, leurs tuniques paraissent indemnes. Le système lymphatique est hypertrophié, surtout les ganglions inguinaux et rétro-lombaires (voir fig. 3). Enfin, au point d'inoculation, il s'est formé un abcès de la grosseur d'un œuf de pigeon rempli d'un pus grumeleux.

Là encore les examens microscopiques et les colorations habituelles nous ont permis de retrouver notre *Actinomyces*.

II. Recherches sérologiques au moyen du sang de malade

A. *Agglutination.*

La sporo-agglutination a été effectuée sur une culture de *Sporotrichum Beurmanni*, retirée de notre mycothèque :

Nous avons prélevé dans la culture sus-mentionnée, âgée de deux mois, quelques gros fragments ; nous les avons triturés très finement dans un mortier de verre avec du sérum physiologique que l'on incorpore ainsi de façon à obtenir une émulsion bien homogène. Nous l'avons filtrée sur un petit entonnoir pourvu d'un filtre blanc ordinaire, mouillé au préalable. On l'a examinée au microscope (oculaire 4, objectif 8) et diluée ensuite de façon à avoir 130 à 150 spores par champ microscopique.

Ceci fait, nous avons versé dans de petits tubes les quantités données ci-dessous d'émulsion et de sérum de sang de malade atteint d'actinomycose.

1° XIX gouttes d'émulsion + 1 goutte de sérum non dilué = dilution 1/20 ;

2° XVI gouttes d'émulsion + IV gouttes sérum dilué 1/10 = dilution 1/50 ;

3° XVIII gouttes d'émulsion + II gouttes sérum dilué 1/10 = dilution 1/100 ;

4° XIX gouttes d'émulsion + I goutte sérum dilué 1/10 = dilution 1/200 ;

5° XVIII gouttes d'émulsion + II gouttes sérum dilué 1/40 = dilution 1/400 ;

6° XIX gouttes d'émulsion + I goutte sérum dilué 1/40 = dilution 1/800;

7° XX gouttes de culture servent de milieu témoin.

Nous avons agité doucement et placé les tubes à l'étuve à la température de + 37° pendant 1 heure.

L'examen microscopique déjà nous permettait d'apercevoir dans les 3 premiers tubes des grumeaux visibles à l'œil nu.

En procédant à l'examen microscopique d'une goutte de chacune des dilutions, nous avons pu conclure que les spores du *Sporotrichum Beurmanni* avaient été agglutinées pour les dilutions correspondant à 1/20, 1/50 et 1/100 alors qu'elles étaient tout à fait libres et mobiles pour les dilutions 1/200, 1/400 et 1/800.

Le tube témoin a confirmé nos résultats en montrant l'absence d'agglutination.

L'*Actinomyces* étudié a donc un pouvoir agglutinant.

B. *Fixation du complément.*

La technique que nous avons suivie dans une première série de recherches est celle préconisée par BORDET-WASSERMANN pour la séro-réaction de la syphilis.

Comme antigène nous avons employé une culture pure et vivante de l'*Actinomyces*. Cette dernière était âgée de 10 jours et tout à fait homogène.

L'anticorps était constitué par le sérum du malade provenant d'une prise de sang faite dans une veine du pli de coude. Ce sérum est inactivé par un chauffage d'une demi-heure à 56°.

Le sérum frais de cobaye constituait le complément.

Nous avons donc versé dans différents tubes à des doses que nous résumerons dans le tableau qui suit, la culture, le complément, le sérum physiologique; nous avons mélangé doucement et placé les tubes à l'étuve à la température de + 37° pendant 4 heures pour permettre une bonne fixation.

On a ajouté ensuite la sensibilisatrice et les globules rouges de mouton lavés et dilués à 5 %. Nous avons placé de nouveau les tubes à l'étuve à 37° pendant 1 heure.

Tels sont les résultats obtenus.

Remarque : Nous résumons dans le même tableau les résultats trouvés en opérant avec l'*Actinomyces* ALLENBACHII.

Tubes	Sérum	Culture	Complément	Eau salée	Sensibilisatrice	Globules rouges	Hémolyse A. pulmonalis	Hémolyse A. Allenbachii
	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.		
1	0,2	0,2	0,1	1,4	0,1	1	+	+
2	0,2	0,4	0,1	1,2	0,1	1	±	O
3	0,2	0,6	0,1	1	0,1	1	O	O
4	0,2	—	0,1	1,6	0,1	1	+	+
5	—	0,2	0,1	1,6	0,1	1	+	+
6	—	0,4	0,1	1,4	0,1	1	+	+
7	—	0,6	0,1	1,2	0,1	1	+	+
8	—	—	0,1	1,8	0,1	1	+	+
9	—	—	—	2	—	1	O	O

Nous voyons que le tube 4 contenant le sérum du malade mais pas de culture, produit l'hémolyse, par conséquent ne dévie pas le complément.

Il en est de même pour les tubes 5, 6, 7 contenant la culture, mais pas de sérum du malade.

Nous pouvons déjà conclure que le sérum du malade contient une sensibilisatrice spécifique.

Nous avons cependant corroboré nos résultats par une deuxième série d'expériences en utilisant la technique de CALMETTE et MASSOL (86) pour la recherche des anticorps tuberculeux.

Cette méthode exige trois séries de tubes. Dans la première, on verse une quantité fixe de sérum à éprouver, inactivé par un chauffage à + 56° pendant une demi-heure, on ajoute une quantité fixe de l'antigène, puis une dose croissante d'alexine. On complète au volume de 2 cc. 5 avec de l'eau salée, on agite, on place à l'étuve pendant 1 heure à + 37°, on ajoute 1 goutte de globules rouges lavés et 0,1 cc. de sérum hémolytique.

On reporte les tubes à l'étuve à + 37° pendant 1/2 heure et on examine.

Dans la deuxième série de 3 tubes (témoin sérum), on a la même quantité de sérum que dans les tubes de la première série, mais absence d'antigène.

Dans la troisième série (témoins antigènes) on a la même quantité d'antigène que dans les tubes de la première série, mais absence de sérum.

Le tableau qui suit indique les résultats obtenus :

Tubes	Sérum	Culture	Complément	Eau salée	Globules rouges Gttes.	Sensibilisatrice	Hémolyse A. pulmonalis	Hémolyse A. Allenbachii
1	0,2	1 cc	0,1	1,2	I	0,1	O	O
2	0,2	1 cc	0,2	1,1	I	0,1	O	O
3	0,2	1 cc	0,3	1	I	0,1	+	+
4	0,2	1 cc	0,4	0,9	I	0,1	+	+
5	0,2	1 cc	0,5	0,8	I	0,1	+	+
6	0,2	—	0,1	2,2	I	0,1	+	+
7	0,2	—	0,2	2,1	I	0,1	+	+
8	0,2	—	0,3	2	I	0,1	+	+
9	—	1 cc	0,1	1,4	I	0,1	+	+
10	—	1 cc	0,2	1,3	I	0,1	+	+
11	—	1 cc	0,3	1,2	I	0,1	+	+

Nous voyons là aussi que l'antigène à lui seul (tubes 9, 10, 11) ne dévie pas le complément; le sérum du malade seul (tubes 6, 7, 8) pas davantage.

Nous basant sur les deux séries d'expériences, nous pouvons certifier que le sérum du malade contenait une sensibilisatrice spécifique.

La réaction de la fixation du complément est donc nettement positive.

Conclusion.

En nous basant :

1° Sur l'étude morphologique et biologique du parasite isolé à partir des expectorations de la malade;

2° Sur les propriétés biochimiques et protéolytiques caractéristiques pour l'espèce en question;

3° Sur les résultats positifs des inoculations aux animaux de laboratoire et l'examen des coupes histologiques;

4° Sur les recherches sérologiques.

Nous pouvons écarter l'idée de tuberculose et affirmer que nous avons affaire à une actinomycose pulmonaire.

Le traitement interne au moyen de doses progressives de teinture d'iode données plusieurs fois par jour, a réalisé chez la malade, au début, une amélioration notable et à l'heure actuelle la guérison.

L'organisme isolé des crachats présentait les caractères suivants :

1° Filaments mycéliens continus, fragiles, ramifiés dont le calibre est inférieur à 1 μ. — Présence de formes spirilles et tortillons;

2° Files d'arthrospores de 0,6 μ de diamètre à nombre variable;

3° Organisme très difficile à cultiver;

4° Cultures non efflorescentes et sans odeur;

5° Ne liquéfie ni la gélatine ni le sérum;

6° Ne produit pas de diastase;

7° Filaments mycéliens et arthrospores colorés par la méthode de GRAM, non acido-résistants;

8° Pathogène pour les cobayes avec lesquels nous avons pu reproduire les lésions typiques de l'*Actinomycose*.

D'après ses caractères microscopiques et culturaux, notre parasite peut être classé en suivant la systématique de LANGERON dans :

la famille des	Hyphomycètes;
Groupe des	Microsiphonés;
Genre	Actinomyces Harz;
Sous-genre	Euactinomyces;
Section des	Parasitici;
Sous-section des	Breviores.

Cette espèce est voisine de l'*Actinomyces pulmonalis* Roger, Sartory, Bory (1909).

Elle s'en différencie par le calibre plus grêle de ses filaments.

Le résumé qui suit exprime les caractères comparatifs entre les deux organismes.

Actinomyces pulmonalis (Roger, Sartory, Bory).	Actinomyces étudié.
Filaments	
Fragiles, immobiles, peu enchevêtrés, ramifications latérales très irrégulièrement distribuées.	Fragiles, immobiles, non enchevêtrés, ramifiés; ramifications latérales irrégulièrement distribuées.
Largeur des filaments 0,4 µ à 0,5 µ.	Largeur des filaments 0,3 µ à 0,4 µ.
Largeur des arthrospores 0,7µ à 0,9 µ.	Largeur des arthrospores 0,6µ à 0,7 µ.
Gélatine et sérum	
Pas de liquéfaction.	idem.
Lait	
Pas de coagulation, mais peptonisation lente.	Pas de coagulation ni peptonisation.
Action sur les sucres	
Réduit le maltose et le lactose.	Ne réduit pas le lactose, très faible assimilation du maltose.

Action sur le rouge neutre

Pas de virage.	idem.

Cultures

Les meilleures sur SABOURAUD maltosé.	idem.

Fixation du complément

Positive.	idem.

Nous ne pensons pas faire de notre parasite une espèce nouvelle et nous le rangeons dans la catégorie de l'*Actinomyces pulmonalis*. Nous en faisons la variété : A. pulmonalis var. gracilis.

CHAPITRE IV

Étude morphologique et biologique de l'Actinomyces à pigment rouge

Ses caractères culturaux sur les différents milieux.

1° *Observation :*

La malade (1) est âgée de 11 ans; le 4 juillet 1931, elle présente une infiltration ganglionnaire sous-maxillaire avec périadénite; la peau est légèrement adhérente, mais nullement altérée, à la palpation on constate une douleur; l'hypothèse de carie dentaire est émise; la visite dentaire montre que les dents sont indemnes. Un traitement par le soleil artificiel est institué en même temps que des frictions à l'iode et des pansements chauds; la radiographie ne donne rien de particulier, elle montre l'os intact, mais rappelle cependant l'image d'une tuberculose. Par la suite, le ganglion se ramollit peu à peu; la peau s'amincit et rougit. On pratique plusieurs ponctions, qui donnent un pus assez liquide, verdâtre : le médecin traitant envisage une incision pour éviter la fistulisation; mais la fillette ne se présentant plus, la fistule se produit pendant ce temps. Des examens bactériologiques pratiqués sur le pus vers la fin du mois de juillet sont restés négatifs vis-à-vis des acido-résistants. On continue le traitement par le soleil et des pansements de *Salantol*, vaccin polyvalent. Des ensemencements ont été faits et à la suite de ces recherches nous avons pu isoler le parasite en question. On s'est décidé alors à instaurer un traitement spécifique à la fin du mois d'octobre par administration interne de la teinture d'iode à doses progressives 7 fois par jour de 1 à

(1) Nous tenons à exprimer ici nos plus vifs remerciements au Docteur *Allenbach*, médecin-chef de *l'Hospice Stéphanie*, qui a bien voulu nous communiquer l'observation de la malade et le matériel qui nous a permis de mener à bien cette étude.

60 gouttes. Quelque temps plus tard, la fistule se recouvre de croûtes. Radiologiquement on perçoit des tâches irrégulières, provenant d'une calcification du pus; celui-ci s'élimine de temps à autre par petits grains blanchâtres. Après 3 mois de traitement iodé on constate une cicatrice adhérente au plan profond et une infiltration ganglionnaire du volume d'une noisette, la région n'est plus sensible.

2° *Isolement.*

C'est à partir de petites particules prélevées aseptiquement par ponction de la glande sous-maxillaire et ensemencées sur jus de pomme de terre alcalin que nous avons pu isoler, à l'état de pureté, un *Actinomyces* à pigment rouge.

3° *Cultures en goutte pendante.*

Elles sont effectuées dans des boîtes de BORREL, sur la lamelle desquelles nous avons déposé une goutte de jus de pomme de terre alcalin. Aussitôt ensemencés, les milieux de culture sont placés à la température de + 27°, qui, nous le verrons plus loin, représente la température optima.

La poussée de notre organisme ne se fait pas attendre. Après 24 heures déjà, on voit apparaître quelques colonies rougeâtres. Nous suivons la croissance au moyen de la culture en goutte pendante au microscope à l'immersion et nous notons que les filaments végétatifs sont courts, homogènes, non cloisonnés, en général droits, parfois légèrement ondulés. Au bout de 48 heures, sur le filament principal, prennent naissance des ramifications irrégulièrement distribuées, de la manière suivante : un petit soulèvement se produit qui grandit et donne un prolongement de même largeur que le filament principal, mais assez court. Les rameaux insérés sur l'axe forment avec lui un angle parfois droit, parfois plus ou moins ouvert, ils ne sont jamais cloisonnés et leur diamètre est toujours inférieur à 1 μ.

Des colorations effectuées alors au moyen de bleu de méthylène très dilué nous permettent de constater une membrane mince d'un bleu foncé, limitant un protoplasma bleu clair, parsemé de petits points colorés plus intensément. La recherche de ces granulations par la méthode de SARTORY,

dont nous avons déjà cité les détails au début de notre travail, nous a constamment donné de bons résultats.

Dans les cultures âgées de quelques jours, nous trouvons en plus des éléments énumérés jusqu'ici, des filaments en forme de fourche et de T, dont la partie inférieure est légèrement infléchie.

En outre, certains rameaux ne sont pas homogènes, et les frottis préparés par exemple avec le bleu de méthylène très dilué laissent ressortir des espaces clairs, séparant deux parties fortement colorées. Nous avons alors l'impression que le contenu cellulaire a disparu en certains endroits. Les fragments ainsi formés sont, au début, de dimensions très différentes; les intervalles incolores alternent très irrégulièrement. Par contre, dans des cultures plus âgées, les filaments prennent l'allure de petits bâtonnets plus longs que larges, assez réguliers et remplis de granulations

La mesure de ces filaments varie entre 0,5 μ et 0,7 μ.

L'organisme coloré par la méthode de GRAM résiste à la décoloration par l'alcool, mais les éléments ne présentent au ZIEHL aucune acido-résistance.

La fragmentation d'un rameau ne commence pas toujours à partir de son extrémité. Nous avons pu la voir débuter au milieu d'un filament, puis en une période de temps assez courte, tout le rameau avait subi le même sort.

Continuant nos examens, nous avons pu suivre comment certaines ramifications peuvent donner naissance à des files d'*arthrospores*. Ces dernières sont de dimension plus grande. Leur diamètre est compris entre 0,8 μ et 0,9 μ. La forme des éléments qui les composent est plus ou moins sphérique. Le plus souvent, les spores prennent naissance à l'extrémité d'un filament qui s'est renflé. Il se produit alors comme un étranglement du siphon entre 2 parties à protoplasma condensé.

En général, les chaînettes d'arthrospores sont assez fragiles. Il arrive que les spores se détachent, s'arrondissent et on peut les retrouver dans les frottis éparses ou formant des sortes de chaînettes dont le nombre des éléments est variable, de 3 à 8. Ces arthrospores, ensemencées sur des milieux frais, peuvent germer.

Les filaments mycéliens sont bien plus courts que ceux de la première espèce étudiée. Leur longueur est très variable elle oscille entre quelques μ et une cinquantaine de μ.

Après 3 semaines environ, le développement paraît terminé. Nous ne notons plus l'apparition de nouvelles formes, ni de variations importantes dans ce que nous avons décrit jusqu'ici dans la culture en cellule.

Quant à la structure de notre organisme, nous n'insisterons pas sur les formes végétatives directes. Ces éléments ont été décrits et examinés en tous détails et très exactement par NEUKIRCH et LIESKE, nous ne ferons que souligner l'exactitude des observations de ces deux auteurs, et nous ne mentionnerons que les faits suivants :

En milieu solide, comme nous venons de le faire remarquer, il y a présence de filaments longs, plus ou moins épais, ramifiés, non cloisonnés, homogènes, droits ou ondulés; d'autre part d'éléments plus ou moins longs, ressemblant à de grands bâtonnets, réunis en chaînettes droites ou courbées. Puis, présence de filaments avec arthrospores unilatérales, centrales ou bilatérales et de chaînettes isolées d'arthrospores sphériques ou ovalaires. Ces dernières se trouvent aussi en grand nombre en milieux liquides et dans les cultures riches en oxygène et on doit les considérer comme des éléments durables à vie ralentie, formes de résistance. Dans les milieux liquides surtout, on trouve une autre forme d'éléments constituant le dépôt des cultures : les oïdiospores, filaments végétatifs à diamètre plus grand que les filaments normaux, souvent cloisonnés par une simple membrane et formant ainsi des cellules polymorphes, épaisses, à membrane simple.

Dans tous les milieux liquides, on remarque en outre des formes en massues. Ces dernières sont GRAM positives, homogènes, et résultent uniquement d'un ralentissement de la croissance en longueur d'un filament, occasionné par des conditions physiques ou biochimiques extérieures. Ces formes n'ont donc aucun caractère de spécificité pouvant servir à un diagnostic différentiel, car toutes les espèces d'*Actinomyces* que nous avons eu l'occasion d'examiner au cours de notre travail, ont pu présenter, dans les conditions données, cet aspect.

Notre technique a surtout été très minutieuse dans l'étude de la constitution morphologique de la cellule de l'*Actinomyces*. Nous pouvons tout d'abord confirmer l'existence d'une simple membrane, l'absence constante de cloisons dans les filaments végétatifs, les oïdiospores excepté.

Les vues de LIESKE (80 et 82) sur l'homogénité du cytoplasme sont très probablement exactes et nous ne croyons pas qu'il existe une zone extérieure (Aussenplasma) et une zone intérieure (Innenplasma), tel que NEUKIRCH a cru l'observer. Nous avons contrôlé ce fait, sur des préparations entre lames et lamelles; ni par montagnisation, ni par plasmolyse au moyen de solutions concentrées de chlorure de sodium ou de phosphate monopotassique; nous n'avons pas pu suivre ces phénomènes différentiels indiqués par NEUKIRCH. Les colorations vitales par le LUGOL ou le bleu de méthylène ne sont pas démonstratives à ce sujet.

Par contre, nous soulignons point par point les indications de NEUKIRCH (29) sur la présence d'éléments nucléiques (Körnchen) à l'intérieur de la cellule actinomycétienne. Nous ne pouvons qu'admirer l'exactitude et le don d'observation de cet auteur, qui, dans des conditions encore très peu favorables, a pu suivre et décrire la division de ces éléments et leur pouvoir primitif de copulation avec beaucoup de précision, tel que nous allons le voir dans nos indications. Nous voulons tout d'abord reproduire textuellement les indications de NEUKIRCH : « Les grains se trouvent dans le plasma... Ils sont isolés les uns des autres à des distances variées. Dans les filaments épais, ils ne se trouvent pas sur le même plan, mais ils sont partagés sur la périphérie; souvent ils forment comme un mamelon sur la membrane, mais ils sont situés à l'intérieur du plasma, car par plasmolyse on peut suivre leur déplacement en rapport avec le plasma. Les grains se colorent à l'aide du bleu de méthylène très intensément; ils se colorent par le rouge de *Ruthenium*, par la *fuchsine* formolée et par le rouge neutre, en rouge. La coloration de NEISSER est positive et rappelle l'image du bacille diphtérique. La solution de LUGOL les colore en brun foncé. Le Sudan III ne les colore pas. Ils existent dans tous les filaments et aussi dans les oïdiospores. Par contre, dans les arthrospores, ils sont réduits à une taille tellement petite, que j'ai

des doutes sur leur identité avec les grains ordinaires. Mais après germination des spores, on ne trouve dans les jeunes filaments que des grains de très petite dimension comme dans les spores. Le nombre de grains augmente seulement dans les filaments en croissance; dans les parties un peu éloignées de l'extrémité antérieure du filament, ils ne se multiplient plus, leur nombre est toujours constant; leur position reste invariable. Les grains ne peuvent donc pas être considérés comme produits de dégénérescence. J'ai suivi la division d'un grain. A ce moment le grain augmente un peu et s'allonge; une demi-heure après ou un peu plus tard on trouve à la même place deux grains assez rapprochés qui se séparent ensuite de plus en plus..... Il y a, en outre, un rapport entre la position du grain et l'accroissement des filaments. Près de l'extrémité du filament on trouve toujours un grain, de même à l'endroit où une ramification du siphon doit se produire. »

Nous avons étudié de très près tous ces phénomènes, soit en goutte pendante, soit en cultures en boîte de Borrel, soit sur des frottis fixés.

En microculture, nous avons tout d'abord effectué nos ensemencements, en partant des cultures provenant de milieu de Sabouraud glucosé gélosé, sur bouillon ou eau peptonée à 2 %, sur sérum physiologique à 7,5‰ et 9‰, sur solution de carbonate de soude à 3 % et à 5 %. En nous servant de ces microcultures, nous avons alors, au moment voulu pour l'examen microscopique, effectué des frottis. Ces préparations ont été fixées soit par la chaleur, soit par l'alcool à 96°. Cette dernière technique nous a permis d'obtenir des colorations bien plus détaillées pour les prélèvements effectués dans des cultures âgées de plus de 24 heures, car, dans les cultures dépassant ce terme de croissance, on a constaté une diminution du pouvoir chromophile pour les colorants basiques d'aniline, due probablement à la production du pigment idiogène de notre organisme.

Les différentes techniques de coloration que nous avons utilisées ont été les suivantes :

1° Coloration vitale par le bleu de méthylène ou le rouge neutre;

2° Coloration de cultures jeunes séchées sur la lame, non fixées et colorées directement par la fuchsine phéniquée, lavage à l'eau ordinaire et recoloration au moyen du bleu de méthylène;

3° Coloration des frottis fixés par la méthode de NEISSER;

4° Coloration des frottis fixés par la méthode de GRAM;

5° Coloration des frottis fixés par la méthode de SCHUMACHER;

6° Coloration des frottis fixés par une méthode de SCHUMACHER modifiée par nous de la façon suivante :

a) On lave la préparation dans l'alcool, on laisse sécher;

b) On fixe à la chaleur par le passage dans la flamme 3 fois;

c) On colore avec le violet de gentiane dont on rejette l'excès;

d) On fait agir la solution de LUGOL;

e) On lave à l'alcool, puis à l'eau;

f) On colore par la phosphine à 1 %;

g) On lave à l'eau;

h) On colore par l'éosine;

i) On lave à l'eau, on sèche et on examine.

Cette technique nous a donné des résultats très satisfaisants et une interprétation très rigoureuse.

Nous donnons à présent l'ensemble de nos observations constatées au cours de ces expériences.

En partant d'une culture sur milieu de SABOURAUD glucosé gélosé, nous ensemençons successivement différentes gouttes de sérum physiologique, en flambant après chaque ensemencement le fil de platine et en le rechargeant chaque fois par contact avec la dernière goutte de sérum ensemencé. Nous obtenons ainsi pour la 4e goutte une microculture très diluée et ne contenant que très peu d'éléments myco-

siques. Les formes initiales trouvées dans ces cultures sont représentées dans la fig. 1, planche II. Elles sont constituées essentiellement par des filaments courts, peu ramifiés, plus ou moins bacilliformes. Ces éléments restent sans modification appréciable pendant un examen de 2 heures environ. Au bout de ce temps, nous ajoutons une nouvelle goutte de sérum physiologique stérile à 7,5 °/₀₀, afin d'éviter une évaporation de la microculture. L'effet de cette addition de liquide sur les éléments mycosiques peut alors être suivi. Pendant les premières 15 minutes, nous avons pu assister à l'accroissement des filaments, mais celui-ci se caractérise bien moins par un allongement que par l'apparition d'une ramification. Nous avons retenu dans l'image N° 2, Planche II, quelques-uns de ces phénomènes. On note, par la coloration modifiée de SCHUMACHER, tout d'abord une légère hypertrophie de l'extrémité d'un filament. Le corpuscule nucléaire situé dans cette extrémité augmente de volume. Il se forme une petite hernie sur le filament. Le corpuscule se divise en deux et à ce moment les deux branches du filament subissent un accroissement trés accentué. A l'extrémité de chaque nouveau rameau se trouve un corpuscule. Mais le même phénomène nucléaire peut aussi se produire sur une partie plus centrale du siphon. Une portion du corpuscule reste alors dans le filament mère, l'autre émigre dans le nouveau rameau secondaire qui se place à peu près à angle droit par rapport au filament primaire et qui subit un allongement presque subit. De ce fait, nous concluons que cette ramification peut être aussi bien monopodiale que dichotomique typique, toutes les deux intimement liées à la division préalable d'un corpuscule nucléaire. Ces ramifications et l'accroissement du thalle mycélien se suivent alors avec une grande intensité. A l'intérieur des siphons mêmes, le morcellement des corpuscules nucléaires continue, sans qu'il soit nécessaire que se produise, pour chaque division corpusculaire, une ramification secondaire. D'autre part, le cytoplasme se concentre de plus en plus autour des masses nucléaires et bientôt apparaissent des lacunes à l'intérieur du siphon, qu'on observe déjà en culture directe sans coloration. On arrive alors à des formes filamenteuses allongées, ondulées ou en fouet, telles que notre figure 3, Planche II, essaye de les reproduire.

Les éléments qui sont ainsi dépourvus en partie de leur cytoplasme et qui sont limités uniquement par la membrane du siphon actinomycétique, se disloquent naturellement très facilement par le moindre choc ou le déssèchement et on obtient alors des fragments filamenteux plus ou moins longs, irréguliers, en forme d'haltère, de bâtonnets ou de filaments que LACHNER avait confondus avec les vrais arthrospores de SAUVAGEAU et RADAIS et que NEUKIRCH appelle avec raison une « pseudo-fragmentation », se rencontrant surtout dans les vieilles cultures. Ce sont plutôt des phénomènes de dégénérescence que des phénomènes reproducteurs. En effet, si on réensemence sur milieu de SABOURAUD ces stades évolutifs, la culture reste stérile.

Si, par contre, par addition successive de 2 heures en 2 heures de sérum physiologique ou de solution de carbonate de soude aux microcultures, on évite d'un côté la dessiccation de celles-ci et de l'autre on augmente, à la suite de l'évaporation continuelle, la concentration du milieu de culture, le phénomène d'accroissement du thalle et le morcellement nucléaire continuent invariablement et on obtient un mycélium ramifié, atrophique, hypertrophié, vésiculeux avec des corpuscules nucléaires innombrables de taille très variable, tel que nous essayons de le reproduire dans nos dessins 4, 5 et 6.

En observant de plus près ces dessins, on se rend facilement compte que les corpuscules nucléaires en se divisant deviennent de plus en plus petits, de sorte qu'ils arrivent à la limite de la visibilité, même en examinant avec l'immersion au 1/18 et avec l'oculaire 9 de compensation. Ils acquièrent ici une sorte d'attraction sexuée. Celle-ci devient même si prononcée, que souvent les corpuscules échappent complètement de leur enclave protoplasmique et à l'aide d'un petit pédoncule protoplasmique émigrent dans la direction d'un corpuscule issu d'un autre fragment filamenteux.

Ce phénomène de copulation devient encore plus net dans la figure 7, Planche II, tel que nous avons pu l'observer dans de nombreuses microcultures âgées de 8 à 16 heures et colorées ensuite par notre méthode de SCHUMACHER.

On ne peut effectivement pas s'expliquer autrement des formes de cette configuration, que par une attraction sexuée

résultant de la juxtaposition de 2 cenogametocytes issus de filaments biodynamiques.

On peut facilement vérifier que ce phénomène résulte d'un facteur évolutif en ajoutant à la microculture de l'eau distillée à la place de solutions aqueuses salines à différentes concentrations. Dans ces conditions, le pouvoir dynamogénétique des corpuscules nucléaires reste invariablement identique et nous ne constatons jamais l'apparition de la fragmentation nucléaire suivie d'une attraction sexuée.

Le phénomène sexué devient par la suite encore plus apparent. Dans la figure 7, Planche II, on note déjà l'apparition d'une forme très caractéristique : la forme en T. Dans nos cultures nous avons toujours pu observer, dans certaines conditions, l'apparition de deux sortes d'éléments de forme très remarquable. La forme en T et la forme en Y (double Y) Cette dernière a déjà été observée et décrite par LIESKE sous le terme de « *Vierhyphenspore* ».

La figure 8, Planche II, et les suivantes permettent de comprendre la genèse et le rôle de ces éléments.

On voit tout d'abord un filament donnant naissance à une ou deux ramifications monopodiales, mais ces rameaux secondaires, au lieu de subir un allongement subit, n'évoluent guère; on assiste à une concentration très marquée du cytoplasme tout entier contenu dans le siphon vers les extrémités. Les corpuscules nucléaires subissent dans chaque rameau une sorte de morcellement ou de division, de façon qu'il est possible de compter dans chaque branche 4 ou 8 corpuscules. Souvent, on voit ensuite une ou deux branches se vider complètement, tandis que les portions renfermant le protoplasme condensé s'hypertrophient et à ce moment, les corpuscules nucléaires issus de différents rameaux toujours sous l'influence du pouvoir dynamogénétique accru, semblent se fusionner deux par deux en s'attirant réciproquement. Finalement, il résulte une grande cellule en forme de bâtonnet très gros à pôles arrondis, fortement chromophile, renfermant 2 grands corpuscules nucléaires entourés chacun d'une forte calotte de protoplasme. Ces cellules sont munies d'une membrane double et c'est peut-être ces éléments qui ont incité NEUKIRCH à parler de la présence d'une membrane, d'un ectoplasme et d'un endoplasme.

Nous avons donc affaire à une cellule à membrane double, à un protoplasme fortement condensé, à 2 corpuscules nucléaires situés vers les deux pôles de la cellule, sans vacuole, ni produits de déchets. Ces éléments peuvent rester pendant un temps très long dans le milieu de sérum physiologique concentré ou dans la solution de carbonate de soude à 5 %, sans subir la moindre modification. Mais, si on dilue le milieu ou si on porte stérilement ces cellules sur milieu de SABOURAUD solide ou liquide, elles commencent à germer. Les 2 corpuscules nucléaires se fusionnent tout d'abord pour se diviser immédiatement après. (Processus observé sous le microscope dans une période de 3 à 5 minutes.) La cellule s'allonge alors subitement par une extrémité et, à ce stade, les corpuscules nucléaires disparaissent et on n'observe qu'une cellule renfermant un grand nombre de toutes petites granulations, impossible à distinguer sans diaphragmer très fortement et sans faire varier la position du miroir du microscope. Finalement, on obtient un siphon qui ne tarde pas à se ramifier. On assiste à la formation des arthrospores typiques, tels que leur origine a été décrite en tout détail par NEUKIRCH et LIESKE. Ces arthrospores naissent sur n'importe quel endroit du siphon, soit aux extrémités des différents rameaux, soit directement latéralement sur les parois du siphon par la formation de petits bourgeonnements.

Nous n'insistons pas sur l'interprétation de ces phénomènes. Toujours est-il que par la triple coloration différentielle de SCHUMACHER, l'identification de ces corpuscules comme substances chromatiques ne laisse aucun doute. Si nous n'avons nulle part pu constater l'existence d'un réseau de chromosomes, nous avons cependant la certitude, vu les divisions et fusions successives et la caractérisation par les colorations spécifiques, qu'il s'agit de corpuscules chromatiques nucléaires ou de rudiments de noyaux cellulaires, capables de se diviser en deux parties égales, de s'unir dans des conditions spéciales rappelant un acte de copulation et doués en sorte d'une valeur dynamique variable suivant les conditions vitales (Dynamogénie isoforme ou Dynamogénie autogénétique).

4° *Caractères culturaux.*

Notre organisme est ensemencé sur les milieux solides suivants : sur RAULIN acide et neutre, tous deux solidifiés par la gélose; sur pomme de terre simple, glycérinée, maltosée ou glucosée; sur carotte simple ou macérée dans une solution de glucose à 2 %; sur jus de pomme de terre alcalin gélosé et sur banane. Les cultures sont placées à la température de + 27° qui est la plus favorable pour l'espèce considérée.

Culture sur jus de pomme de terre alcalin : 48 heures après l'ensemencement sur tubes inclinés, on assiste à la formation d'un enduit rouge dont la teinte correspond au n° 36 du code des couleurs (Klincksieck et Valette). En 10 à 15 jours, le champignon donne une traînée continue présentant une partie médiane surélevée, mamelonnée et des parties latérales minces avec stries radiaires. La coloration est rose dans les parties profondes du tube et passe au rouge au voisinage de l'orifice. En vieillissant, le champignon revêt un aspect poudreux.

Remarquons ici que les premières cultures sur jus de pomme de terre n'étaient pas luxuriantes. C'est seulement après quelques ensemencements que l'organisme, s'habituant à ce milieu nutritif, finit par recouvrir de ses colonies toute la surface du substrat, en un temps variant entre 20 et 25 jours. Nous n'avons jamais pu observer sur ce milieu une poussée du champignon apigmenté.

Dans la suite, lors de l'étude de la matière colorante, pour obtenir un rendement plus grand, nous avons ensemencé sur boîtes de PETRI. Au bout d'une dizaine de jours, nous voyons en différents points, une partie surélevée, grosse comme la tête d'une épingle d'un rouge vif et tout autour formant un cercle et s'irradiant vers le centre de nombreuses colonies. Parfois la forme est allongée, les bords festonnés. Dans d'autres cas, on dirait de petites verrues rougeâtres, accolées les unes aux autres.

Les examens microscopiques effectués de temps en temps, avec et sans coloration, montrent la prédominance des filaments mycéliens, non enchevêtrés les uns dans les autres, en général droits, parfois légèrement ondulés. Les ramifica-

tions sont assez fréquentes et irrégulièrement distribuées. On note aussi la présence de bâtonnets longs et d'arthrospores.

Tous ces éléments sont GRAM positifs, mais non acido-résistants.

La pomme de terre simple ou glycérinée constituent un milieu assez peu satisfaisant; l'Actinomyces forme une pellicule très mince, recouvrant une partie seulement de la surface du milieu en une quinzaine de jours. Cette pellicule se parsème de points plus foncés de plus grande épaisseur, sa couleur est moins vive que sur jus de pomme de terre.

Les cultures effectuées sur pomme de terre macérée dans une solution de glucose ou de maltose à 2 %, n'ont pas donné de bons résultats.

Sur carotte simple, la poussée se fait très lentement. Après 5 à 6 jours, on aperçoit des petites colonies punctiformes rouges, qui s'élargissent assez peu et dont la croissance s'arrête après une quinzaine de jours.

Sur carotte maltosée, la culture est à peine appréciable.

La banane se rapproche de la carotte simple au point de vue de la croissance du champignon.

Sur milieu de RAULIN neutre ou acide, solidifiés par la gélose, les premières colonies apparaissent au bout de quelques jours. Elles sont rosées, ne s'étendent pas beaucoup en surface et revêtent un aspect poussiéreux.

De tous les milieux nutritifs employés jusqu'ici, le jus de pomme de terre solidifié par la gélose est le plus favorable. C'est donc à lui que nous aurons recours plus tard pour obtenir de grandes récoltes.

Nous avons en outre ensemencé notre *Actinomyces* sur les milieux liquides suivants : milieu de RAULIN acide ou neutre; jus de pomme de terre alcalin; bouillon de viande ordinaire et glycériné; moût de bière; SABOURAUD liquide maltosé ou glucosé; milieu peptoné à 2 %.

Culture sur RAULIN neutre : Ce substrat est excellent, au bout de 48 heures, on remarque au fond du tube un petit dépôt muqueux, très adhérent, légèrement rosé. La culture

évolue assez rapidement, sans que le liquide se trouble. Après une vingtaine de jours, elle semble avoir atteint le maximum de développement et présente alors l'aspect d'un gros flocon d'ouate presque transparent, rosé, se détachant difficilement. Si l'on agite le tube, une partie se sépare en forme de vrilles. Il en est de même sur les parois du tube où l'on observe quelques colonies qui par agitation se détachent aussi en petites vrilles donnant à la solution un aspect très curieux.

Nous n'avons jamais pu apercevoir la formation d'un voile, même en exposant les cultures aux températures de + 22° et + 37°.

Avec le milieu de RAULIN acide, la luxuriance est moins grande, le dépôt, moins abondant, se désagrège plus facilement.

Sur milieu de SABOURAUD liquide, on obtient une culture floconneuse, immergée, très faiblement rosée, qui constitue un dépôt assez important. Le milieu reste clair.

Sur milieu de SABOURAUD maltosé ou glucosé le développement est bien moins satisfaisant.

Sur jus de pomme de terre alcalin, après deux à trois jours, on voit apparaître de petits flocons rosés au fond du tube. A la surface du bouillon, contre les parois, un anneau de quelques millimètres de largeur prend naissance, d'un rouge plus vif à la partie tournée vers l'orifice du tube, il se continue en de petits filaments très fins. Une partie très légèrement rosée plonge dans le liquide, le reste des filaments s'étend à la surface et forme ainsi un voile rougeâtre très fragile.

Sur le milieu peptoné à 2 %, la poussée du champignon présente beaucoup d'analogie avec celle obtenue sur milieu de RAULIN neutre.

Le moût de bière est un milieu médiocre.

Le bouillon de viande glycériné est plus favorable que le bouillon de viande ordinaire. A la température de + 27°, le développement se fait d'une manière très satisfaisante. Le deuxième jour, on aperçoit au fond du tube des colonies

incolores, qui évoluent assez rapidement et forment un dépôt de la grosseur d'une noisette.

Nous devons souligner que dans toutes nos cultures sur milieux liquides, il n'y a jamais eu diffusion de la matière colorante; au contraire, dans la profondeur du tube, la coloration rouge qui caractérise si bien notre organisme, a toujours fait défaut.

Bien que nous n'ayons jamais constaté de changement dans la nature morphologique de notre espèce, notre étonnement fut grand cependant en voyant que les colorations par les colorants basiques d'aniline ordinaires et par la méthode de GRAM devenaient moins nettes après quelques mois de culture.

Afin d'éclaircir cette question nous avons essayé d'ensemencer notre *Actinomyces* sur des milieux bien différents.

Les premières cultures, faites sur le milieu à l'œuf de DORSET, n'ont pas donné de bons résultats, tout au plus quelques colonies rouges, grêles.

Un deuxième ensemencement est opéré sur le milieu à l'œuf de PÉTROF, là encore la poussée du champignon n'est pas satisfaisante; malgré des repiquages successifs, nous n'avons pas réussi à obtenir un bon développement.

Nous avons eu plus de succès avec le substrat suivant, qui est le fruit d'essais nombreux.

Asparagine	1,0 gr.
Chlorure de sodium	1,0 »
Sulfate de magnésium	2,5 »
Sulfate de fer	traces
Phosphate de sodium	5,0 »
Glycérine	5,0 »
Extrait de Liebig	5,0 »
Jaunes d'œuf	V
Beurre	10,0 »
Eau distillée	1000,0 »

Dans les premières 48 heures de petites colonies rouges ressortent très nettement sur ce fond jaune. La poussée est

rapide. Au bout d'une dizaine de jours, tout le milieu nutritif est recouvert par un tapis homogène très mince. La teinte est d'un beau rouge. A l'examen microscopique nous remarquons que les filaments mycéliens ont la même largeur que ceux constatés jusqu'ici sur les différents substrats. Il y a, en outre, des éléments à aspect bacillaire, des formes en massue, des arthrospores. Les granulations sont très caractéristiques surtout après coloration.

Nous avions un instant pensé faire acquérir une certaine acido-résistance à notre organisme, en l'ensemençant successivement et à plusieurs reprises sur ces milieux, dont les deux premiers sont couramment employés pour les cultures du bacille tuberculeux. Cependant toutes les colorations par le ZIEHL sont restées négatives.

En utilisant la méthode de GRAM, le champignon résiste 20 sec. environ à la décoloration par l'alcool. Les frottis sont plus nets encore, si nous avons la précaution de dissoudre au préalable le pigment de l'*Actinomyces* dans de l'alcool bouillant.

Nous pensons donc que la diminution du pouvoir chromophile de notre organisme dans les vieilles cultures doit surtout être imputable à la couche de pigment idiogène qui, avec l'âge, s'accumule autour des filaments et empêche ainsi, plus ou moins, la fixation du colorant d'aniline.

Propriétés biologiques

1° *Optimum cultural — Action de la chaleur.*

Les cultures de notre organisme ont été faites sur jus de pomme de terre solidifié par la gélose et ajusté à un pH = 7,2. Les milieux sont placés dans des étuves réglées aux températures de + 4°, + 12°, + 18°, + 27°, + 37°, + 42°.

A + 12°, le champignon pousse encore, mais très lentement. A + 4° et + 42° il n'y a plus aucun développement et ces températures doivent être considérées comme le minimum et le maximum de température culturale.

A + 18° la croissance est assez bonne quoique retardée.

A + 27° et + 37° les cultures sont les plus luxuriantes.

Mais le maximum de rapidité de croissance et le plus grand poids de la récolte ont été obtenus à + 27°. C'est donc à cette température, qui représente l'optimum cultural, que nos expériences ont été effectuées.

L'espèce étudiée est résistante vis-à-vis de la chaleur. Une culture de 10 jours, placée pendant deux heures à la température de + 50° n'est pas détruite. Le développement est bien arrêté, mais la vie de l'organisme n'est pas abolie, car ensemencé sur un nouveau milieu et mis à la température optima, il va donner une poussée luxuriante.

Une exposition de 20 minutes à + 60° ne suffit pas pour tuer l'*Actinomyces*, les réensemencements vont donner naissance à des colonies nombreuses et riches.

Par contre si on abandonne le champignon 1/4 d'heure à + 70°, sa vitalité est détruite, les cultures sur de nouveaux milieux resteront stériles.

L'organisme résiste bien au froid, nous en avons fait l'expérience en plaçant des tubes ensemencés, pendant 48 heures, dans un seau contenant de la glace et du sel marin. Là encore, l'espèce a conservé toute sa vigueur, et il a suffi qu'on la remette dans des conditions de température favorable, pour que sa croissance reprenne.

2° Étude de la concentration optima en ions H.

Nous avions déjà remarqué, lors de nos recherches sur les caractères culturaux, que, lorsque nous cultivions notre parasite sur des milieux plus ou moins acides, le développement était retardé, parfois même paralysé. Il était donc intéressant de contrôler quelles étaient les concentrations optima, minima et maxima en ions H que pouvait supporter l'organisme.

Sans nous étendre ici sur le pigment qui, lui aussi, est en relation directe avec l'alcalinité et l'acidité du milieu (nous en parlerons d'ailleurs dans un chapitre suivant), nous ne nous occuperons que de la croissance du champignon.

Nous ensemençons toute une série de tubes en faisant varier le pH dans des limites comprises entre pH = 4,5 et pH = 9.

Les mesures ionométriques sont effectuées au moyen du potentiomètre et de l'électrode à antimoine.

Les cultures sont placées à la température optima et observées pendant 3 semaines. Après ce laps de temps, nous avons récolté notre espèce et après un séjour à l'étuve à + 60°, nous l'avons pesée avec précision jusqu'à poids constant.

La meilleure récolte a lieu pour un pH compris entre 7,2 et 7,8 qui représente ainsi la concentration optima en ions H.

La rapidité de la croissance diminue, mais le développement est encore luxuriant jusqu'à un pH = 9.

Mais, si l'évolution du champignon est bonne pour des milieux alcalins, elle se fait plus lentement pour des pH = 6,5 et pH = 6, et est complètement arrêtée pour une concentration en H correspondant à un pH = 5,4 qui constitue ainsi la limite de croissance.

3° *Influence de la lumière.*

Pour étudier l'influence de la lumière sur la poussée de notre *Actinomyces*, nous avons disposé 3 séries de culture à des endroits diversement éclairés.

La première est placée près d'une fenêtre de manière à être exposée à la lumière solaire; la deuxième laissée à l'étuve, n'est donc soumise qu'à une lumière diffuse; la troisième est bien enveloppée à l'aide de papier noir épais. Le développement s'est fait dans tous les tubes, cependant avec un léger retard, il est vrai, pour les cultures exposées à la lumière solaire. Mais si l'on tient compte des différences de température dont eurent à souffrir ces dernières cultures, nous pouvons certainement conclure, que la lumière n'exerce pas d'action appréciable sur la poussée du champignon.

4° *Aérobiose et anaérobiose.*

Ensemencé sur RAULIN neutre, sur SABOURAUD, sur jus de pomme de terre alcalin, l'*Actinomyces* a donné dans la profondeur du tube un dépôt important, mais tout au plus

faiblement coloré. On pouvait se demander si l'oxygène de l'air n'avait pas une influence sur ce phénomène. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons placé les cultures sur jus de pomme de terre gélosé, sous la cloche à vide à 70 millimètres de pression.

Après 3 semaines, nous constatons que la poussée est très faible, mais que les colonies ont conservé leur belle coloration rouge. Nous concluons que le développement de l'organisme est retardé dans une atmosphère pauvre en oxygène, mais quant à la substance chromogène, elle est sécrétée même en l'absence d'oxygène. La non-apparition du pigment pour les cultures immergées dans les milieux liquides doit être attribuée probablement à une hydrolyse qui transformerait la matière colorante en un leucodérivé incolore.

Chapitre V

Propriétés biochimiques et protéolytiques

1° *Action sur les nitrates.*

Ensemencée sur eau peptonée contenant 1 % de nitrate de potassium, la culture est assez luxuriante, nous n'avons jamais pu constater de dégagement gazeux. La recherche des nitrites au moyen de la métaphénylènediamine est restée négative.

2° *Action sur les sucres.*

Pour connaître le pouvoir diastasique et assimilateur de l'espèce, on a employé la même technique que lors de l'étude de l'*Actinomyces pulmonalis*.

Nous nous sommes servis, comme milieu de culture, du liquide de Raulin dépourvu de sucre, en ayant soin d'ajouter chaque fois le sucre à étudier dans les proportions suivantes : 3 % pour le glucose pur et brut, le lévulose, le galactose et 5 % pour le saccharose, le maltose, le lactose pur et brut. La moitié des tubes non ensemencés, soumis à des conditions rigoureusement identiques à ceux contenant la culture, ont servi de témoin.

Les recherches ont été effectuées après 4 jours, 12 jours et un mois en faisant usage de la méthode de Bertrand.

Nous n'avons jamais pu constater de fermentation caractérisée par un dégagement de gaz carbonique et production d'alcool. Les dosages ont prouvé que l'*Actinomyces* était incapable d'assimiler les sucres, qui sont donc pour lui de très mauvais aliments.

Les expériences répétées en présence de substance quaternaire, la peptone, ont donné les mêmes résultats négatifs.

3° *Action sur l'amidon.*

Au bout d'une dizaine de jours, le champignon donne une pellicule rouge très mince, la gelée d'amidon ne s'est pas désagrégée ou liquéfiée; elle s'est colorée en bleu foncé par contact avec la solution de LUGOL, sauf autour des colonies où s'était opérée une transformation de l'amidon, démontrant ainsi la présence d'amylase dans notre organisme.

4° *Action sur le rouge neutre.*

Effectuée sur le milieu déjà signalé au chapitre II pour l'*Actinomyces pulmonalis*, dans de larges éprouvettes où nous avons introduit un tube à hémolyse renversé, la culture ne nous a permis de constater ni réduction du rouge neutre, ni production de gaz, ni alcalinisation, ni acidification de la solution.

5° *Recherche de l'indol.*

Avec une culture de 25 jours sur milieu peptoné à 2 %, la recherche de l'indol est restée négative.

6° *Action sur la gélatine.*

En piqûre, en l'espace de quelques jours, l'*Actinomyces* produit dans tout le canal d'inoculation de petites colonies rouges, dont l'évolution est assez lente. Après 1 mois, un sillon de quelques millimètres de profondeur s'est creusé sur tout le parcours de la culture, mais aucune liquéfaction n'a pu être mise en évidence.

En surface, nous avons observé la formation d'une cupule. La gélatine est affaissée et parsemée de points rouges.

7° *Action sur le sérum coagulé.*

Le développement est médiocre; après une quinzaine de jours, une petite pellicule, parsemée de points de plus grande épaisseur, donne à la culture un aspect identique à celui observé déjà sur pomme de terre. En vieillissant, elle devient terne et poudreuse. Jamais nous n'avons pu constater de liquéfaction.

8° *Action sur le blanc d'œuf.*

Le blanc d'œuf n'est pas attaqué, l'albumine n'est pas dissoute par l'espèce étudiée, dont la croissance est paralysée sur ce milieu.

9° *Action sur le lait tournesolé.*

Le développement dans le lait stérilisé est faible, la couleur et la réaction ne sont pas modifiées. Nous ne remarquons pas de coagulation, mais une peptonisation lente.

10° *Recherche de la lipase.*

L'*Actinomyces* sécrète une lipase qui a été mise en évidence de la manière suivante : nous avons ensemencé notre champignon dans une boîte de Pétri sur un milieu composé de peptone, d'agar, de 2 % de beurre stérile et de quelques gouttes de teinture de tournesol.

Nous avons remarqué, aux environs des colonies, l'apparition d'une coloration rouge. De plus, nous avons observé, par l'examen microscopique, des cristaux de sels d'acides gras; preuve de la présence d'une lipase qui a transformé la graisse en glycérine et en acides gras.

Chapitre VI

Influence des matières azotées sur la croissance de l'Actinomyces et sur la production du pigment

Cultures sur milieux chimiquement définis à base d'azote.

Nous nous sommes inspirés pour ces recherches du travail de Liot (87) sur le bacille pyocyanique où l'auteur conclut entre autres :

1° La présence d'un sel ammoniacal est nécessaire à la formation du pigment pyocyanique. La nature de l'acide salifié par l'ammoniaque n'est pas indifférente.

2° Les sels d'acides gras monobasiques, d'acides bibasiques se comportent différemment; quelques-uns sont favorables au développement du microbe, d'autres sont inactifs.

3° Les amines, à l'état de chlorhydrates, ne peuvent pas servir à la nutrition du Bacille pyocyanique, même en présence d'hydrate de carbone.

4° Les amides seuls ou en présence d'hydrate de carbone sont de mauvais aliments, à l'exception de l'urée.

5° Les acides aminées sont de moins bons aliments que les sels ammoniacaux.

Connaissant ces résultats, il était intéressant d'apprendre comment notre organisme et son pigment se comporteraient vis-à-vis des matières azotées, espérant de plus trouver, peut-être, une solution sur la formation de la matière colorante.

Il s'agissait avant tout de posséder une source d'aliment la plus simple possible. Après de nombreux essais nous nous sommes arrêtés au substrat suivant :

Chlorure de sodium.....	0,5 gr.
Sulfate de magnésie	2,5 »
Phosphate de sodium	5,0 »
Sulfate de fer	traces
Glycérine	5,0 »
Eau distillée	1000,0 »

Si le champignon est ensemencé sur ce milieu, les colonies apparaissent assez tard; il sera plus facile ainsi de remarquer l'influence des sels azotés que nous ajouterons.

Sur milieu liquide, le dépôt qui prend naissance est incolore; tandis que, si nous avons soin de le solidifier au préalable par la gélose, les cultures qui s'y développeront seront toujours accompagnées de leur pigment, ce qui, par conséquent, en favorisera l'étude.

Nous avons préparé, comme Liot le recommande dans son travail, une gélose minéralisée en faisant dissoudre à l'autoclave la gélose et en ajoutant au liquide presque refroidi, d'une manière aseptique, la solution stérile des sels énumérés ci-dessus. On répartit en tubes stériles en quantités correspondant à 10 cc. Il ne reste plus alors qu'à ajouter, au moment du besoin, la solution du produit azoté, à la gélose minéralisée fondue au préalable au bain marie, à bien agiter et à laisser refroidir en inclinant les tubes.

Milieux employés.

Les cultures ont été faites :

1° En présence de sels ammoniacaux d'acides organiques monobasiques :
Acétate d'ammonium $CH^3\,COO\,NH^4$;
Formiate d'ammonium $H\text{-}COO\,NH^4$.

2° En présence de sels ammoniacaux d'acides organiques bibasiques :
Oxalate d'ammonium $COO\,NH^4\text{-}COO\,NH^4$;
Succinate d'ammonium $COO\,NH^4\text{-}(CH^2)^2\text{-}COO\,NH^4$.

3° En présence de sels ammoniacaux d'acides organiques possédant une ou plusieurs fonctions oxygénées :
Lactate d'ammoniaque $CH^3 - CHOH - COO\,NH^4$;
Tartrate d'ammoniaque $COO\,NH^4 - (CHOH)^2 - COO\,NH^4$.

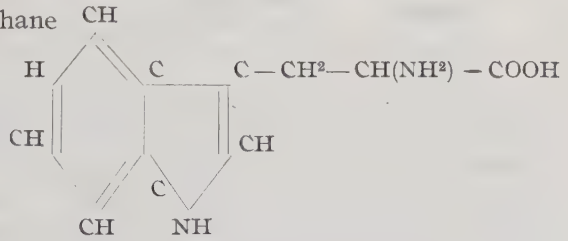
4° En présence d'amides :
Urée $NH^2 - CO - NH^2$;

Guanidine (chlorhydrate) $NH{=}C{<}^{NH^2}_{NH^2\,HCl}$

Asparagine $NH^2 - CO - CH(NH^2) - CH^2 - COOH$.

5° En présence d'acides aminés :
Glycocolle $NH^2 - CH^2 - COOH$;

Tryptophane



6° En présence de sels ammoniacaux minéraux :
Carbonate d'ammonium $CO^3\,(NH^4)^2$;
Sulfate d'ammonium $SO^4\,(NH^4)^2$;
Azotate d'ammonium $NO^3\,NH^4$.

7° En présence de sucres et d'alcool polyatomique :
Glucose, galactose, lévulose, lactose, maltose, saccharose, glycérine, mannite.

Nous avons donc préparé les solutions aqueuses des différents produits énumérés, en tenant compte du poids moléculaire et en faisant en sorte que la quantité d'azote corresponde pour chacun d'eux à 0,01 ; chiffre que des expériences antérieures nous ont établi comme suffisant et favorable pour un bon développement.

Les milieux ensemencés sont placés à la température de + 27°. Après 3 semaines, la croissance est arrêtée. La récolte est placée sur un filtre qui est pesé avec précision, postérieurement à un séjour à l'étuve à + 60°, jusqu'à poids constant.

Dans une première série d'expériences, les cultures ont été effectuées en présence d'un alcool polyatomique : la glycérine.

Le poids de récolte le plus grand a été obtenu avec l'asparagine; viennent ensuite la guanidine et l'oxalate d'ammonium; puis le succinate, le lactate, le tartrate d'ammonium, le tryptophane; ensuite l'acétate, le formiate, le carbonate d'ammonium et pour finir le glycocolle, le sulfate, l'azotate d'ammonium et, en dernier lieu, l'urée.

Nous résumons dans le tableau qui suit les quantités de sels ammoniacaux employés, le développement du champignon et la production de la matière colorante.

PRODUIT	Poids mol.	Teneur en N	Sol. nécess. pr. 10 cc.	Culture	Pigment
Acétate de NH^4	77	14	0,055	faible	rouge
Formiate de NH^4	63	14	0,045	faible	id.
Oxalate de NH^4	124	28	0,044	très bonne	id.
Succinate de NH^4	152	28	0,054	bonne	id.
Lactate de NH^4	107	17	0,063	assez bonne	id.
Tartrate de NH^4	184	28	0,065	assez bonne	id.
Urée	60	28	0,021	néant	—
Guanidine	95,5	42	0,023	très bonne	rouge
Asparigine	132	28	0,047	très bonne	id.
Glycocolle	75	14	0.053	faible	id.
Tryptophane	204	28	0,073	assez bonne	id.
Carbonate de NH^4	96	28	0,034	faible	id.
Sulfate de NH^4	132	28	0,047	faible	id.
Azotate de NH^4	80	14	0,057	faible	id.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons supprimé la glycérine; nous avons observé alors que la poussée de l'organisme était moins luxuriante; le poids de la récolte pour les différents sels azotés était toujours inférieur à celui obtenu en faisant les cultures en présence de glycérine.

Dans une troisième série d'expériences, nous avons remplacé la glycérine par du glucose. Nous avons ajouté au tube de gélose minéralisée sans glycérine, 10 gouttes de solu-

tion à 2 % de glucose. Les résultats obtenus ne furent pas bons; ce qui nous prouve que le glucose n'a certainement pas une action favorable sur la croissance de l'organisme.

Pour terminer, nous nous sommes demandés comment se comporterait notre champignon sur gélose minéralisée sans glycérine en présence des différents sucres.

Nous avons observé les faits suivants :

Mannite	faible développement	pigment rosé
Glucose	léger développement	id.
Maltose	mauvais développement	id.
Lactose	id.	id.
Galactose	id.	id.
Saccharose	id.	id.
Lévulose	id.	id.

Étant donné le nombre restreint de produits avec lesquels nous avons effectué nos expériences, nous ne nous permettrons pas de trop généraliser nos conclusions.

Toutefois, nous pouvons affirmer que les sels ammoniacaux minéraux étudiés ne sont pas de bons aliments.

Les sucres semblent retarder la croissance du champignon.

Les amides à poids moléculaires élevés, surtout en présence de glycérine, ont été les plus favorables.

Quant à la matière chromogène, elle n'a jamais fait défaut partout où nous avons constaté une poussée du champignon.

2° *Recherches de l'assimilation de la peptone au moyen du réfractomètre de* Fery.

Pour effectuer ces expériences, nous nous sommes adressés à la peptone pour bactériologie des établissements Poulenc. Nous avons travaillé avec une concentration en ions H correspondant à un pH = 7,5, qui s'est montré le plus favorable lors de nos essais préalables. En milieux acides, le rendement est mauvais.

Nous nous permettons de donner des détails sur le mode opératoire suivi. Nous faisons bouillir dans un vase d'Erlenmeyer la solution de peptone; pendant l'ébullition, nous la neutralisons avec une solution de soude N, puis la portons au pH désigné. Après filtration sur papier, nous la répartissons dans des tubes à essai de manière à avoir pour chaque concentration 2 séries de tubes, dont la première sera ensemencée avec le champignon; la deuxième, placée dans des conditions rigoureusement identiques, servira de témoin.

Nous avons préparé des solutions à 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 7 % et 10 %, qui sont stérilisées à + 115°, pendant 20 minutes. Après refroidissement, nous ensemençons, disposons les tubes à la température de + 27° et suivons l'évolution de la culture.

Elle est bien différente : alors qu'au fond de certains tubes, après 3—4 jours, un dépôt adhérent, muqueux prend naissance, nous constatons par contre que la croissance a de la peine à se manifester pour les solutions de peptone supérieures à 4 %.

Nous faisons remarquer une fois de plus que les colonies ont, en général, l'aspect d'un flocon d'ouate très faiblement rosé, fixé au fond de l'éprouvette et se détachant en vrilles par agitation; tandis que pour des concentrations = à 5 %, 7 %, 10 % le très petit résidu qui s'est déposé présente un aspect poussiéreux et se désagrège complètement si l'on agite le tube.

Des prélèvements faits à plusieurs reprises ont permis de retrouver les différentes formes mycéliennes caractéristiques pour l'espèce.

Les cultures laissées un mois à l'étuve, sont filtrées sur filtre d'Iéna, pesé avec précision, avant et après la filtration, postérieurement à un séjour à l'étuve à + 60°, jusqu'à poids constant.

Le liquide clair a servi pour l'examen au moyen du réfractomètre de Fery.

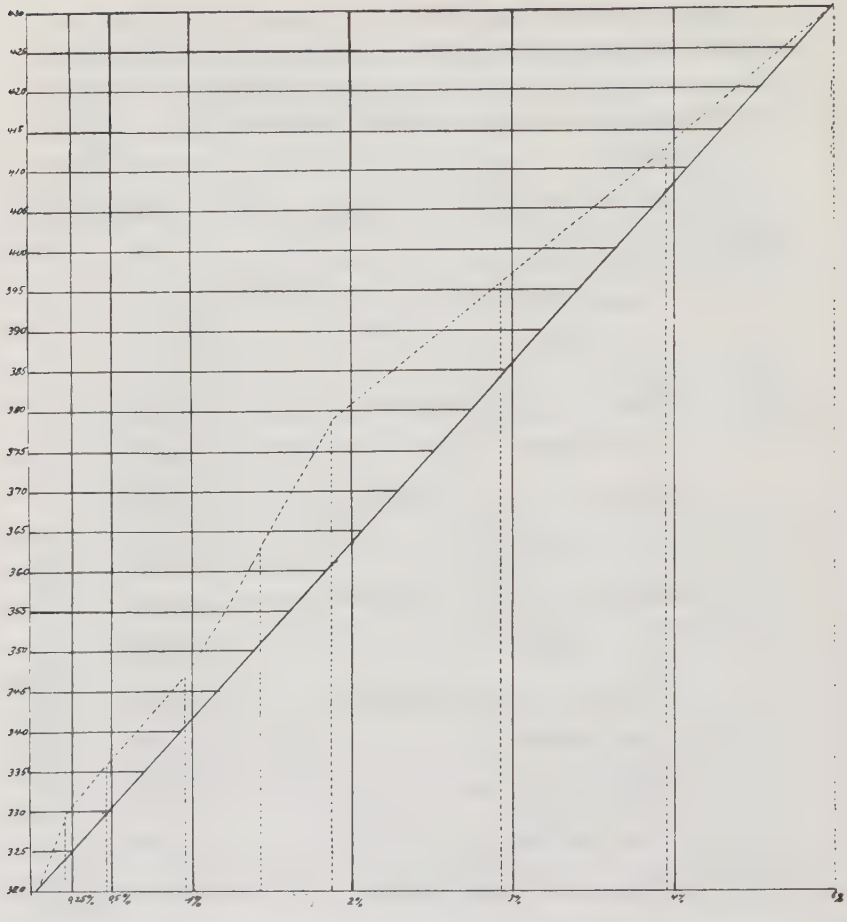
Le poids de récolte le plus grand a été obtenu pour une concentration de 2 % de peptone qui paraît ainsi la plus favorable à la végétation.

Nous avons noté une différence à peine appréciable pour les solutions de 3 % et 1,5 %; puis pour les solutions de 1 %, de 4 %, de 0,5 % et de 0,25 %; le poids de la récolte était insignifiant pour les milieux contenant 5 %, 7 % et 10 % de peptone.

Les examens au moyen du réfractomètre ont donné les résultats suivants :

1° Témoin 0,25 de peptone	1,3325
+ culture	1,3324
2° Témoin 0,5 de peptone	1,3331
+ culture	1,3330
3° Témoin 1 % de peptone	1,3342
+ culture	1,3341
4° Témoin 1,5 % de peptone	1,3353
+ culture	1,3351
5° Témoin 2 % de peptone	1,3364
+ culture	1,3361
6° Témoin 3 % de peptone	1,3386
+ culture	1,3384
7° Témoin 4 % de peptone	1,3408
+ culture	1,3407
8° Témoin 5 % de peptone	1,3431
+ culture	1,3430–31
9° Témoin 7 % de peptone	1,3475
+ culture	1,3474–75
10° Témoin 10 % de peptone	1,3540
+ culture	1,3539–40

Pour mieux faire ressortir sur le graphique ci-joint les différences constatées, nous avons supprimé les résultats obtenus avec les solutions contenant 7 % et 10 % de pep-



tone, puisque pour ces concentrations les courbes coïncideraient à peu près.

En outre pour donner plus d'amplitude à la courbe, nous avons multiplié par le même facteur les chiffres représentant les indices de réfraction de la culture.

Chapitre VII

I. Action pathogène expérimentale

3 cobayes ont été inoculés au moyen d'une émulsion de culture dans le sérum physiologique. Deux par voie intrapéritonéale (4 cc.) et un par piqûre intracardiaque (1 cc.).

Première expérience : L'animal inoculé par voie intrapéritonéale (4 cc.) pesait 380 gr. (2 öses de culture dans 4 cc. de sérum physiologique). Au bout de 9 jours, après avoir diminué constamment de poids, il meurt. A l'autopsie nous remarquons que les poumons, le système lymphatique pneumo-bronchial, le pancréas sont intacts. Les 3 tuniques des bronches lobulaires n'ont rien de particulier, pas d'éléments mycéliens. Le foie est très hypertrophié, la rate a fortement augmenté de volume et est lésée. Les ganglions inguinaux, brachiaux et mésentériques sont parsemés de points blancs, le péritoine est infiltré. Dans toutes les lésions décrites nous avons retrouvé le parasite. L'examen histologique des coupes effectué à partir des organes atteints a permis de déceler la présence de grains actinomycosiques.

Deuxième expérience : Le deuxième cobaye inoculé par piqûre intracardiaque (1 öse de culture dans 1 cc. de sérum physiologique) le 24 novembre, pesait 550 gr. Après avoir notablement diminué de poids jusqu'au 10 décembre (525 gr.) 510 gr., 495 gr., 485 gr.) et donné tous les symptômes de l'actinomycose, l'animal finit par triompher de la maladie; dès lors son poids augmente constamment; à la fin du mois de janvier on inscrivait 640 grammes.

Troisième expérience : Un troisième animal pesant 335 gr. est inoculé également par voie intrapéritonéale, à la fin du mois de février, au moyen d'une émulsion très diluée de la culture de l'*Actinomyces* rouge sur jus de pomme de terre

(1 öse dans 4 cc. de sérum physiologique). L'animal diminue de poids, après 15 jours nous sacrifions le cobaye pour avoir son sérum et nous constatons à l'autopsie la confirmation des lésions déjà citées lors de notre première inoculation, surtout pour le foie et la rate. Les autres organes sont macroscopiquement intacts.

II. Recherches sérologiques au moyen du sang de malade

A) *Agglutination.*

Le sérum du cobaye agglutine les spores du *Sporotrichum Beurmanni* pour des dilutions correspondant à 1/20, 1/50 et 1/100 alors que la réaction s'est montrée négative pour les dilutions 1/200, 1/400 et 1/800.

B) *Fixation du complément.*

Nous n'insisterons plus ici sur la technique suivie, tous les détails ont été donnés au chapitre III. Nous noterons simplement que nous avons employé comme antigène une culture âgée de 15 jours, pure et vivante et rendue homogène par de fréquentes agitations.

L'hémolyse ne s'est pas produite en utilisant selon la technique de Bordet-Wassermann 0 cc. 4 et 0 cc. 6 de culture et selon la technique de Calmette-Massol 0 cc. 1 et 0 cc. 2 de complément. Par conséquent, le complément était déjà fixé, le sérum du malade contenait une sensibilisatrice spécifique et les réactions ont donné un résultat positif.

Conclusion

D'après les caractères botaniques et biochimiques de l'espèce étudiée et en nous appuyant sur les résultats des inoculations aux animaux de laboratoire et sur l'examen direct, nous pouvons affirmer que le malade était bien atteint d'*Actinomycose*. L'idée de tuberculose doit être certainement éloignée.

Le traitement interne par la teinture d'iode, à doses progressives 7 fois par jour, employé simultanément avec le traitement local par le soleil artificiel et les frictions à l'iode ont réalisé, après une amélioration notable progressive, la guérison.

L'organisme, isolé du pus des glandes sous-maxillaires, présentait les caractères généraux suivants :

1° Filaments mycéliens continus, ramifiés, dont le calibre est inférieur à 1 μ, donnant naissance à des arthrospores et se segmentant en forme bacillaire.

2° Organisme assez facile à cultiver.

3° Sur milieu solide, les cultures, sans odeur, deviennent poudreuses en vieillissant.

4° Absence d'acido-résistance.

5° Ne liquéfie ni la gélatine, ni le sérum coagulé.

6° Donne des cultures assez pauvres sur pomme de terre.

7° Est pathogène pour le cobaye.

Bien que notre champignon sécrète des endo-diastases, nous pensons cependant le mettre dans la sous-section des *Minores*, dont il se rapproche le plus par l'ensemble de ses propriétés.

En suivant la systématique de LANGERON, notre parasite doit être classé dans la

famille des	Hyphomycètes,
Groupe des	Microsiphonés,
Genre	Actinomyces HARZ,
Sous-genre	Euactinomyces,
Section des	Parasitici,
Sous-section des	Minores.

L'*Actinomyces* diffère par ses dimensions, par les caractères de ses cultures et ses propriétés, des Actinomyces chromogènes décrits jusqu'à ce jour.

Nous le dédions au Docteur ALLENBACH et proposons pour lui le nom d'*Actinomyces* ALLENBACHII.

Chapitre VIII

Étude de la substance chromogène

1° *Sa localisation.*

Adoptant ici la classification de Beijerink (88), nous rappelons que ce dernier distingue :

1° Les bactéries dont le corps est incolore, mais qui sécrètent un pigment dans le milieu ambiant. Ce groupe prend le nom de « *microorganismes chromopares* ».

2° Les bactéries dont le pigment ne diffuse pas, mais chez lesquelles il est fortement lié à la membrane cellulaire, tandis que l'organisme reste incolore. Ce deuxième groupe forme celui des « *microorganismes parachromopares* ».

3° Il faut ajouter enfin un troisième groupe constitué par les bactéries, dont le contenu cellulaire est coloré, mais dont le pigment ne diffuse pas, ce sont les « *microorganismes chromophores* ».

Or, dans toutes les cultures effectuées, jamais nous n'avons constaté une diffusion de la substance chromogène. A l'examen microscopique, le corps de notre parasite s'est toujours montré incolore. Le pigment siège dans la membrane, l'*Actinomyces* rentre donc dans le groupe des « *microorganismes parachromopares* ».

2° *Conditions de production du pigment.*

a) Conditions physiques.

Influence de la concentration du milieu de culture en ions H. La réaction du milieu a une importance notable si ce n'est directement sur l'apparition du pigment, du moins sur l'intensité et la variation des teintes.

Nous avons fait varier la concentration en H dans une série de milieux, dans des limites comprises entre pH = 4,5 et pH = 9. Nous avons constaté que partout où les colonies avaient pris naissance, elles étaient accompagnées de la

substance chromogène. Par contre, nous notons pour un pH = 9 un pigment correspondant au numéro 62—63 du code des couleurs de KLINCKSIECK et VALETTE (89). Pour un pH = 6,5, le pigment correspond au N° 41 ; pour un pH = 6 au N° 42. Pour un pH inférieur à 6 absence complète de colonie.

Influence de la lumière et de la température : Nous n'avons observé aucune action sur la substance chromogène en exposant les milieux de cultures à des sources de lumière très différentes. Quant à la température, pour autant qu'elle reste comprise dans des limites permettant la vitalité du champignon, elle n'exerce pas d'influence sur la matière colorante.

Influence de l'oxygène : L'intervention de l'oxygène ne semble pas absolument nécessaire pour la production de la substance chromogène. Nous l'avons remarqué, en plaçant les cultures sous la cloche à vide ou en fermant les tubes ensemencés au moyen d'un capuchon en caoutchouc. Toutefois, il faut ajouter que l'évolution en l'absence d'oxygène, est excessivement faible.

b) Conditions chimiques.

Lors de nos nombreuses expériences ayant pour but l'étude des propriétés morphologiques, biologiques et protéolytiques de notre champignon, nous avons pu constater que les substances quaternaires, sans être de nécessité absolue pour la production du pigment, jouaient cependant un rôle favorable au point de vue de l'intensité des teintes.

Quant aux substances ternaires, elles se comportent bien différemment. Si la glycérine, par exemple, est favorable à la végétation du parasite et à l'apparition de la substance chromogène, il n'en est pas de même pour les sucres, qui semblent affaiblir le pouvoir colorant et retarder la poussée du champignon.

La suppression successive, dans les milieux de culture, des éléments minéraux, tels que le fer, le sulfate de magnésie, les phosphates, le chlorure de sodium, n'a pas empêché l'apparition du pigment.

Le sulfate de magnésie cependant semble avoir une action stimulante; mais aucun des sels minéraux n'est indispensable pour la substance chromogène, qui prend naissance dans des conditions chimiques très différentes.

Chapitre IX

Essais d'isolement du pigment

a) *Solubilité.*

Le pigment brut est insoluble dans l'eau neutre, acidifiée ou alcalinisée; dans l'eau chloroformée, dans l'alcool dilué à froid, dans l'alcool méthylique et amylique, dans l'éther, l'acétone, le chloroforme, le xylol, le benzol, le pétrole, l'éther de pétrole, l'huile d'olive, la paraffine, la glycérine, le sulfure de carbone.

Si on l'agite avec de l'alcool à 90° à froid, ce dernier prend une teinte rosée; si on chauffe, la matière colorante passe dans le solvant; les corps bactériens se décolorent complètement et prennent un aspect grisâtre.

Débarrassé d'une partie de ses impuretés, le pigment est soluble dans l'éther à froid.

b) *Absorption du colorant.*

Nous avons essayé de fixer le colorant sur du coton et de la laine, mais sans résultat. Le papier Laurent, les filtres de Kitasato le laissent passer sans aucune modification. Par contre, il est possible de l'isoler en lui faisant traverser une bougie de talc ou de charbon. Nous donnons ci-dessous la technique que nous avons adoptée :

Les corps bactériens colorés sont traités par l'alcool à chaud. La solution rouge obtenue, après filtration sur un filtre ordinaire, est additionnée d'un volume d'eau égal. Le liquide reste clair. Nous distillons l'alcool dans le vide, la matière colorante reste en suspension dans l'eau. Nous la recueillons en la faisant passer à travers une bougie de talc de 20 cm. de hauteur et de 4 cm. de diamètre, lavée au préalable à l'éther, au chloroforme et à l'alcool bouillant. La substance

chromogène retenue par le talc est isolée au moyen d'alcool chaud. Le pigment ainsi obtenu ne cristallise pas. Nous avons eu recours dans la suite à d'autres procédés, qui nous ont donné de meilleurs résultats.

c) *Méthode physique de* Goppelsrœder (90) *basée sur l'analyse capillaire.*

Pour reconnaître si notre pigment correspondait à une ou à plusieurs substances colorantes, nous avons eu recours à la méthode de Goppelsrœder, qui permet en outre d'obtenir à l'état de pureté, des colorants non cristallisables.

Comme le pigment est soluble dans l'alcool, c'est avec une solution alcoolique concentrée que nous avons opéré : on a tout d'abord coupé, dans le sens de la longueur, des feuilles de papier filtre très pur, de manière à obtenir des bandes de 2 cm. ½ de largeur et de 30 cm. de longueur. Ces bandes sont suspendues à l'embouchure de tubes à essai. Les récipients, fermés hermétiquement, sont placés à l'étuve à + 60° pour sécher pendant 2 jours. Nous introduisons ensuite la solution à examiner, de manière que les bandes plongent environ de 2 cm. dans le liquide. Les tubes sont fermés à nouveau hermétiquement et abandonnés à la température du laboratoire.

Par cette méthode, nous avons pu constater que, par l'ascension du liquide, une seule zone colorée se formait; ce qui nous fait conclure que nous avons affaire à une substance chromogène unique.

d) *Méthodes chimiques d'isolement*

Nous ne devions pas obtenir satisfaction, en nous adressant à la méthode de Thumm (91), ainsi qu'à celle de Grimbert-Lasseur (92) qui sont surtout employées pour les bactéries chromopares dont le pigment diffuse dans le milieu ambiant.

Après de nombreux essais sans résultat, nous avons réussi à obtenir la substance chromogène à l'état de pureté en employant la méthode citée par Ph. Lasseur et F. Girardet (62) dans leur contribution à l'étude des pigments microbiens; méthode qui leur a permis d'isoler la *prodigiosine* du *Bacillus prodigiosus*.

Le mode opératoire est le suivant : Les cultures sont traitées par l'alcool à 95°. Nous filtrons et évaporons dans le vide. Le résidu est repris par l'alcool absolu. Une addition d'eau précipite la substance chromogène de sa solution. On la recueille par centrifugation et on la dissout à nouveau dans l'alcool. La solution est filtrée, évaporée dans le vide et reprise par l'éther anhydre. Le pigment reste en solution. Cette dernière est mise dans une ampoule à décantation et additionnée d'un volume d'eau identique. Nous agitons, nous laissons reposer; l'eau prend une teinte légèrement jaunâtre. Lasseur et Girardet qui avaient fait déjà cette constatation lors de leur étude sur la *prodigiosine* se sont posé la question pour savoir, si le pigment jaune entraîné était un produit d'oxydation. « Nous l'ignorons, ajoutent-ils. Tout ce que nous pouvons dire, c'est qu'il s'agit d'un colorant différent de celui resté en solution dans l'éther. Car la matière colorante dissoute dans l'éther est insoluble dans l'eau, mais soluble dans l'alcool. »

Après décantation et lavage à l'eau, à plusieurs reprises, nous évaporons dans le vide. Le résidu qui reste, présente un aspect brun-rougeâtre. Il est insoluble dans l'eau. Nous le dissolvons dans l'éther.

La solution du pigment dans l'éther est rouge, de même que dans l'alcool. Si nous ajoutons quelques gouttes d'ammoniaque, la solution devient orangée.

Si à 10 cm. de solution alcoolique nous ajoutons 2 gouttes de soude N/10 nous obtenons une liqueur jaunâtre, qui redevient rouge par addition d'eau distillée.

Or, toutes les réactions décrites ci-dessus ont été obtenues par Lasseur et Girardet avec la *prodigiosine*.

Nous voyons donc que les propriétés chimiques de notre pigment se rapprochent beaucoup de celles de la *prodigiosine*.

La substance colorante ainsi isolée ne cristallise pas. Les réactions effectuées avec cette dernière ont permis de constater, en adoptant la classification chimique établie par Verne (93), qui comprend 9 séries de matières colorantes, que notre pigment n'entre dans aucun des groupes que nous donnons ci-dessous :

1° La série terpénique : hydrocarbures et pigments dérivés, *Carotinoïdes ;*

2° Pigments ternaires non azotés rattachés à des séries de carbures aromatiques, *Anthraquinones ;*

3° Groupe de la *Pyrone ;*

4° Pigments lipidiques;

5° Groupe de l'*Indol ;*

6° Groupe du *Tetrapyrrol ;*

7° Pigments protéiques;

8° Pigments de désintégration des Protéiques;

9° Pigments de désintégration des Nucléines.

Bien plus, les premiers résultats obtenus jusqu'ici, qui nous ont tout d'abord fort surpris, ont montré que c'est du côté des pigments bactériens proprement dits, plus directement vers la *prodigiosine,* que nous devions orienter nos recherches.

Aussi avons-nous eu recours aux travaux très récents et patients de WREDE et de son école (76) pour essayer d'obtenir la substance colorante à l'état cristallisé. Nous rappelons que ces auteurs sont arrivés pour la première fois à faire cristalliser le pigment du *Bacillus prodigiosus* et en ont préparé une série de sels purs. Nous avons suivi la même technique :

Les cultures sont agitées à plusieurs reprises dans une ampoule à décantation avec de la soude caustique à 10 %. On ajoute ensuite un même volume d'alcool et d'éther de pétrole et on agite énergiquement. La séparation des deux liquides se fait très lentement. La couche inférieure contenant l'alcool et la soude caustique, quoique colorée, renferme très peu de pigment et peut être jetée; tandis que la couche supérieure tenant en solution la matière colorante, est agitée à 5 reprises différentes avec un volume d'éther de pétrole identique. Nous avons ajouté chaque fois une très petite quantité d'alcool pour faciliter la séparation de l'émulsion.

Les extraits d'éther de pétrole rassemblés sont évaporés jusqu'à un volume de 50 cm. et agités 3 fois avec 250 cc. d'eau pour entraîner les traces d'alcool. Après filtration, nous éva-

porons jusqu'à un volume de 25 cc. et faisons passer dans la solution un courant d'acide chlorhydrique gazeux et sec, obtenu par l'action de l'acide sulfurique pur sur du chlorure de sodium. Par ce procédé la matière colorante est transformée en chlorhydrate, cristallisé en forme hexagonale (Fig. 6).

Après évaporation de la solution, le résidu est dissous dans l'alcool à 96° à chaud, filtré et additionné d'acide perchlorique à 5 % jusqu'à commencement de trouble. On laisse évaporer lentement, la substance cristallise sous forme d'aiguilles jaune-rougeâtres (Fig. 5).

Le sel formé est soluble dans l'alcool, mais pas dans l'eau.

On peut régénérer la *prodigiosine* de la manière suivante : le perchlorate est dissous dans l'alcool à chaud et additionné de soude caustique à 10 % jusqu'à ce que la coloration vire au jaune brun. On laisse reposer une heure, filtre, on ajoute environ 10 cc. de chloroforme et 40 cc. d'eau. En agitant, la matière colorante passe dans le chloroforme. Ce dernier est débarrassé de l'alcool au moyen de l'eau distillée; on filtre et on évapore lentement. La *prodigiosine* se présente alors sous l'aspect d'une masse amorphe à éclat métallique verdâtre.

e) *Analyse spectroscopique.*

N'ayant pas à notre disposition de spectrographe à absorption dans l'ultrat violet, nous nous sommes contentés de noter le spectre d'absorption du pigment dans la région visible. Les valeurs obtenues avec une solution renfermant 0,45 mgr. de pigment dans 100 cc. d'alcool pur à 96° nous ont donné pour une épaisseur de 10 mm. :

1re bande de $\lambda = 548$ à $\lambda = 525$;
2e bande de $\lambda = 508$ à $\lambda = 490$;
3e bande;

pour une épaisseur de 25 mm. :

1re bande de $\lambda = 553$ à $\lambda = 530$;
2e bande de $\lambda = 505$ à $\lambda = 480$;
3e bande $\lambda = 470$ (?).

Le maximum d'absorption de ces bandes est :

1re bande $\lambda = 538$
2e bande $\lambda = 496$
3e bande $\lambda = 470$?

Le cliché (Fig. 7) joint à ce travail photographié à l'aide du spectrophotomètre Chauvin et Arnoux de la Faculté de Pharmacie, permet de fixer ces bandes qui ont été déterminées par le professeur Vlès, que nous remercions bien sincèrement.

Conclusion : En nous basant sur les propriétés chimiques et physiques et l'analyse spectroscopique de notre pigment, nous devons le rapprocher de la *prodigiosine.*

C'est la première fois que cette matière colorante est signalée chez les *Actinomyces.*

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

De l'ensemble de nos recherches, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Nous avons isolé d'expectorations, chez une femme suspecte de tuberculose pulmonaire, un Actinomyces présentant les caractères suivants :

a) Organisme très difficile à cultiver;

b) Filaments mycéliens continus, fragiles, ramifiés, dont le calibre est inférieur à 1 μ. Présence de formes spirilles et tortillons;

c) Files d'arthrospores de 0 μ 6 de diamètre en nombre variable;

d) L'organisme ne liquéfie ni la gélatine, ni le sérum.

e) Tous les éléments sont colorables par la méthode de GRAM, mais ne présentent pas d'acido-résistance.

f) L'étude de l'action pathogène expérimentale a donné des résultats positifs sur le cobaye;

g) Nous en avons fait une variété de l'*Actinomyces pulmonalis* ROGER, SARTORY et BORY 1909 et nous lui donnons le nom d'*Actinomyces pulmonalis* var. *gracilis*.

2° Une nouvelle espèce de *Microsiphonée* à pigment rouge a été isolée de glandes sous-maxillaires chez une fillette présentant une infiltration ganglionnaire avec périadénite. Elle appartient au genre *Actinomyces* HARZ, au sous-genre des *Euactinomyces*, à la section des *Parasitici* et à la sous-section des *Minores*. Nous résumons ses caractères comme suit :

a) L'espèce est assez facile à cultiver;

b) Les filaments mycéliens dont le calibre est inférieur à 1 μ sont continus, ramifiés, donnent naissance à des

arthrospores et se segmentent pour produire des formes bacillaires;

c) Les cultures sur milieux solides sont sans odeur, deviennent poudreuses en vieillissant;

d) Tous les éléments restent colorés par la méthode de GRAM et ne présentent aucune acido-résistance;

e) Le champignon ne liquéfie ni la gélatine, ni le sérum; il ne réduit pas les sucres, mais sécrète une amylase et une lipase;

f) en microculture très diluée nous avons pu suivre la division des corpuscules nucléaires, l'attraction sexuée présentée par ces derniers et les processus de germination;

g) L'organisme est pathogène pour les animaux de laboratoire. Par la recherche de la déviation du complément nous avons apporté une preuve du pouvoir pathogène pour les humains;

h) Nous avons étudié au moyen du réfractomètre de FERY l'assimilation des peptones et nous pouvons conclure que l'optimum dans les cultures est réalisé pour une concentration de 2 %;

i) L'*Actinomyces* diffère par ses dimensions, par les caractères de ses cultures et ses propriétés des *Actinomyces* chromogènes décrits jusqu'à ce jour. Nous le dédions au Docteur ALLENBACH et proposons pour lui le nom d'*Actinomyces Allenbachii* n. sp.;

j) Au point de vue de son pigment, l'organisme rentre dans le groupe des « *microorganismes parachromopares* »; la matière colorante présente des propriétés très voisines de celles de la prodigiosine. La cristallisation du principe chromogène et son étude spectroscopique ont confirmé les résultats de nos premières recherches.

NOTES BIBLIOGRAPHIQUES

22 AFFANASIEW : Ueber die klin. Mikroskopie und Bakteriologie der Actinomycosis. *St. Petersburger med. Wochenzeitschr.* 1888.

47 AOYAMA et MIYAMOTO : Ueber die menschenpathogene Streptothrix. Mitteil. aus der Medizin. Fakultät der Kaiserl. japanischen Universität zu Tokio. t. IV. (Anal. in *Centralb. für Bakteriologie* 1901. t. XXIX.).

44 AMOUR BAILLY : Contribution à l'étude des mycoses pulmonaires. Etude d'une nouvelle espèce d'Oospora. O. catarrhalis n. sp. *Th. ph. Strasbourg* 1920/21. p. 52-55.

88 BEIJERINCK : *Botan. Zeitung* 1891, p. 726.

85 G. BERTRAND : Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Sc. Pharmacol.* 1907, p. 7.

67 BIZIO-BARTHOLOMEO : P. Spica sulla materia colorante prodotta dal. Micrococcus prodigiosus di P. Spica M. E. Atti del rale instituto Veneto di scienzes, letture ed arti. Ser. 8, t. 2 1899/1900, disp. 10.

61 BOIS SAINT SEVERIN (du) : Note sur un Streptothrix parasite (Streptothrix aurea). (*Annales de médecine navale* 1895).

34 BOLLINGER : *D. Zschr. f. Tiermed.* 1877,t. 3 und *Zbl. f. med. Wiss.* 1877, t. 15.

35 BOSTROEM : Untersuchungen über die Aktinomykose des Menschens. *Zieglers Beitr.* 1891, t. 9, p. 1.

33 E. BRUMPT : *Précis de parasitologie.* Ed. Paris 1927.

86 A. CALMETTE, L. NÈGRE, A. BOQUET : *Manuel technique de microbiologie et sérologie.* Masson & Cie, Editeurs, Paris 1926, p. 255 et suivantes.

82 CAMINITI : Ueber eine neue Streptothrix species und die Streptothricheen im allgemeinen. *Zbl. f. Bakt.* 1 Orig. 1907, t. 44, p. 193.

28 Chalmers et Christopherson : A. Sudanese Actinomycosis. *Annals of tropical. med. and parasit.* X, n° 2, 1916, p. 223.

19 F. Cohn : Biologische Mitteilungen über Bakterien. 51. *Jber. der Schlesischen Ges. für vaterländ. Kultur* 1874, p. 116-119.

20 — Untersuchungen über Bakterien II, p. 185, *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, t. 1, cahier 3, Breslau 1875, p. 141-208.

45 Conheim : Zwei Fälle von mycosis der Lungen, Wirchows *Archiv.* 1865, t. XXXIII, p. 167.

24 Corda A. G. J. : Pracht-Flora europäischer Schimmelbildungen. Leipzig und Dresden 1839 und Flore illustrée des Mucédinées d'Europe. Leipzig 1840.

32 Paul Ducroux : Contribution à l'étude des mycoses osseuses. *Thèse pharm. Strasbourg* 1930, p. 20-26.

56 H. Eppinger : Ueber eine neue pathogene Cladothrix und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberculosis (Cladothrichica). (*Beitr. zur pathologisch. Anatomie und zur allgem. Pathologie*, Iéna 1890, p. 287-328.)

68 Erdmann: *Journ. für praktische Chem.* Leipzig 1866, p. 385.

15 J. Erikson : Die Pilzkrankheiten der Kulturgewächse. Stuttgart. p. 234-235.

55 Foederl : Zur Therapie der Aktinomykose. *Bericht der deutschen Gesellschaft für Chirurgie* XXXVII. Kongress Wien 1908.

64 Fordos : Recherches sur la matière colorante des suppurations bleues : pyocyanine. *C. R. Ac. Sciences* 51, p. 215, 1869.

27 Foulerton: The streptothrichose and tuberculosis. *Milvoy lecture for* 1910, Londres, James Nisbet and Co, 1910.

10 Fousek : Ueber die Rolle der Streptotricheen im Boden. *Mitt. d. Hochsch. f. Bodenk.* Wien 1912, t. I, p. 217.

3 G. Gasperini : Recherches morphologiques et biologiques sur un micro-organisme de l'atmosphère, le Streptothrix Fœrsteri Cohn. (*Ann. de micrographie* Paris 1890), p. 449-474.

12 — Ricerche morphologiche e biologiche sul genere Actinomyces. *Ann. del Institut. d'Igien. Roma II*, 2, 1892.

4 — Sopro una nuova specie appartenante al genere Streptothrix Cohn (Societa Toscana de Scienz. Naturali. Pise 1891), p. 267-277.

63 Gessard : De la pyocyanine et de son microbe. *Thèse méd. Paris* 1882.

90 Goppelsrœder : Notes sur une méthode nouvelle propre à déterminer la nature d'un mélange de principes colorants. *Bull. Soc. Industr. Mulhouse,* t. XXXII, 1862. Séance du 30 octobre 1861.

70 Griffiths: *C.R.Ac. Sciences,* juillet et décemb. 1892, p.321.

92 Grimbert-Lasseur : Sur l'extraction des pigments bactériens. *C. R. Soc. biol.,* 66e année, vol. 76, 1914, p. 819.

2 M. Gruber : Micromyces Hofmani, *Archiv. f. Hyg.* XVI. 1892.

18 Harz : Actinomyces bovis. Ein neuer Schimmel in den Geweben des Rindes. *Iber. d. Tierarzneisch. z. Münch.* 1877/78, p. 125.

41 Illich : Beitrag zur Klinik der Actinomycose. Jos. Safar, Wien 1892.

84 Jensen : Studien über das Ranzigwerden der Butter. *Zbl. f. Bakt.* II, 1902, vol. 8, p. 171.

38 Jœst E. et Zumpe A. : Zungen- u. Lymphdrüsenaktinomykose. *Zschr. f. Infekt.-Kr. d. Haustiere,* 1913, vol. 13, p. 1-86.

53 Karewski et Urbantschick : Die chirurgische Behandlung der Lungenaktinomykose. *Zentralblatt für Chirurgie,* 1907, nº 31.

11 Heinr. Kayser : Die Flora der Strassburger Wasserleitung 1900.

89 Klincksieck et Valette : Code des couleurs. Kliensieck Ed. Paris 1908.

75 Kraft: Beiträge zur Biologie des Bact. Prodigios. und zum chem. Verhalten seines Pigmentes. *Diss.* Würzburg 1902.

83 Krainsky : Zur Frage der Zellulosezersetzung durch Mikroorganismen. *Russ. J. f. exp. Landw.* 1913, p. 261. *Ref. Zbl. f. Bakt. II,* 1914, vol. 41, p. 296.

58 Lachner-Sandoval : Ueber Strahlenpilze. *Thèse,* Strasbourg 1898.

40 L. Læderich : Actinomycose. Maladies infectieuses et parasitaires. Paris 1925. p. 414.

26 Langeron: Les actinomycoses. Nouveau traité de médecine Roger, Widal Fasc. IV. 2e édition Paris Masson 1925.

62 Ph. Lasseur et F. Girardet : Contribution à l'étude des pigments microbiens. Nancy 1927.

31 Lehmann et Neumann : Bakteriologische Diagnostik. Vol. II, München, Lehmanns Verlag 1912, p. 545.

54 E. Lévy : Ueber die Aktinomycesgruppe und die ihr verwandten Bakterien. *Zbl. für Bakt.*, vol. 26, I, p. 1-12, 1899.

42 Lieblein : Ueber die Actinomykose der Haut. *Beiträge zur klin. Chirurgie*, 1900, vol. 27.

80 Lieske : Allgemeines über Actinomyceten. *Handbuch V. der pathogenen Mikroorganismen*, 1927/1928.

82 — Morphologie u. Biologie der Strahlenpilze. Leipzig 1921.

87 André Liot : Culture du bacille pyocianique sur milieux chimiquement définis. *Thèse Pharmacie*, Paris 1923.

30 Miescher : Ueber einen Fall von Mycetoma pedis nostras. *Thèse Méd.* Basel 1917. Verlag Braumüller, Leipzig.

52 Netter : Trois cas d'Actinomycose thoracique. *Bull. et Mem. de Soc. Méd. Hôp.*, Paris 3 nov. 1893.

29 Neukirch : Ueber Strahlenpilze (Actinomyceten). *Thèse*, Strasbourg 1902.

8 Lombardo Pellegrino : Di una Streptothrix isolata del sottosuolo (*La riforma medica*, nº 39).

39 Poncet et Bérard : Traité clinique de l'Actinomycose humaine. Paris, Masson 1898.

13 V. Riegler : Die Bakterienflora des natürlichen Mineralwassers. *Hyg. Rdsch.* 1902. t. 12, p. 473.

60 P. Riviere : Etude d'un nouveau Streptothrix parasite de l'homme. (*Congrès français de Méd. Bordeaux* 1903).

21 Rivolta : Del cosi detto farcino etc. *Giorn. di Anat. e Fis. degli Animali*. Pisa 1875. p. 215.

43 Roger H., Sartory A., Bory L.: Note sur un nouvel Oospora pathogène (O. pulmonalis). *Bull. de la Soc. de Biologie*, p. 150, 1909.

79 — Oosporose buccale (*Bull. Soc. Méd. des Hôp.* p. 199 à 319).

74 Rosenberg : Beiträge zur Kenntnis der Bakterienfarbstoffe. *Thèse méd.*, Würzburg 1899.

1 E. D. Rossi-Doria : Su di alcune Streptothrix trovate nell'aria. *Ann. de l'Inst. d'igiene*, Rome 1891. t. 4, e

Annali d'igiene sperimentale della R. Univ. Roma, 1892, t. 1.

46 RULLMANN : Ueber eine aus dem Sputum isolierte pathogene Streptothrix. *München. med. Wochenschrift* nº 2.

81 SAMES : Zur Kenntnis der bei höherer Temperatur wachsenden Bakterien und Streptothrix-Arten. *Zschr. f. Hyg.* 1900. t. 33, p. 313.

5 SAN FELICE : Ueber die pathogene Wirkung einiger Streptothrix-Arten. (*Centralblatt f. Bakteriologie Origin.* t. XXXVI, p. 355-367.)

50 A. SARTORY : Oospora acido-résistant. (*Archives de Médecine et de Pharmacie militaires* 1916).

77 — Guide pratique de manipulations de mycologie parasitaire. Paris Ed. Le François 1916.

9 — Etude morphologique et biologique d'un nouvel Oospora, O. Poiraulti. (*Bull. des Sciences pharmacologiques*, t. XX, mai 1913.)

6 — Contribution à l'étude de quelques Oospora isolés de l'air, de l'eau et du sol. (*Bull. des Sciences pharmacologiques* nº 9, septembre 1913.)

49 — Bacille tuberculeux et Oospora acido-résistant. (*Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, mars, Progrès médical 1919.)

48 A. SARTORY et Ph. LASSEUR : Oospora bronchialis. *Bulletin des Sciences pharmacol.* nº 1-2, janvier-février 1916, p. 12.

14 G. SAUVAGEAU et M. RADAIS : Sur les genres Cladothrix, Streptothrix et Actinomyces. Description de 2 Streptothrix nouveaux. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. VI, p. 242-273.)

71 SCHEURLEN : Geschichtliche und experimentelle Studien über den Prodigiosus. *Arch. für Hygiene*, 1896, t. 26, p. 1.

73 SCHNEIDER : Die Bedeutung der Bakterienfarbstoffe für die Unterscheidung der Arten. Arb. aus Bakt. Inst. Karlsruhe, t. I, 1897, p. 203.

72 SCHOTTELIUS : Biologische Untersuchungen über den Micrococcus prodigiosus. Leipzig 1887.

69 SCHRŒTER : Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 1875, p. 109.

78 Schumacher : Ueber den Nachweis des Bakterienkerns und seine chemische Zusammensetzung. *Zentralbl. f. Bakt.* 1 *Abt. Orig.*, t. 97, cahier 2-3. 1926.

66 Jean Sevenet : Étude d'une bactérie chromogène nouvelle. Bacillus Citrulli Sartoryi. Th. ph. Strasbourg 1930.

7 Terni : Eine neue Art von Actinomyces Gruberi. XI intern. Mod. Kongress in Rom. (*Anal. in Centralblatt für Bakt.*, t. XV, p. 362.)

17 L. Thiriet : Contribution à l'étude des Oosporas et des Oosporoses. *Thèse*, Nancy 1919.

57 G. Thiry, Bacille polychrome et Actinomyces mordoré. Paris 1900, p. 82 et suivantes.

37 Thomassen : Die Aktinomykose und ihre Therapie. *Monatsschrift des Vereins für Tierärzte in Oesterreich* 1886. — *Echo vétérinaire de Liége* 1885.

91 Thumm : Arbeit aus dem Bakt. Inst. Karlsruhe, t. I, 1897, p. 291.

23 De Toni et Trevisan : Schizomycetaceae in Saccardo, Sylloge fungerum 1889. VIII.

51 Van Iterson : *Nederland Tijdskrift voor Geneeskunde.* 7 décembre 1892.

93 J. Verne : Couleurs et pigments des êtres vivants. Paris, Colin 1930, p. 16-20.

59 P. Vuillemin : Les champignons parasites dans les mycoses de l'homme. Paris 1931, p. 123-126.

25 Wallroth : Flora cryptogamica Germaniae. Nürnberg 1831, t. 3.

36 Wolff et Israel : Ueber Reinkulturen der Aktinomykose und ihre Uebertragbarkeit auf Tiere. Virchows A. 1891, t. 126.

16 Wollenweber : Der Kartoffelschorf. Der Strahlenpilz (Actinomyces) oder gewöhnlicher Schorf. Arb. Forsch. Inst. Kart. Bau H. 2, 1920, p. 9-31.

76 Wrede et Hettche : Ueber das Prodigiosin, den roten Farbstoff des Bacillus prodigiosus. *Ber. d. Deutschen Chem. Gesellsch.* 1929, p. 2678-2683.

65 Wrede et Strack : Ueber das Pyocyanin, den blauen Farbstoff des Bacillus Pyocyaneus. *Zeitschr. für physiol. Chem.* 140, 1924, p. 1; 142, 1925, p. 103; 177, 1928, p. 177; 181, 1929, p. 58.

TABLE DES FIGURES

Planche I : Différentes formes et aspects de l'*Actinomyces pulmonalis var. gracilis.*

1° Filaments plus ou moins ramifiés ou ondulés.
2° et 3° Formes en massues.
4° Chaînettes d'arthrospores.
5° Longs filaments non sectionnés.
6° Amas d'arthrospores.
7° Séparation d'une arthrospore terminale d'un filament.
8° Forme granuleuse.
9° et 10° Pseudo-fragmentation d'un filament donnant naissance à des formes bacillaires.

Planche II : Différentes formes et aspects de l'*Actinomyces Allenbachii* : L'explication des Figures se trouve dans le texte.

Fig. 1 — Eléments actinomycosiques dans un frottis de crachat du cas n° 1.
» 2 — Aspect de l'*Actinomyces pulmonalis* dans une culture en goutte pendante.
» 3 — Grain actinomycosique dans un ganglion inguinal du cobaye.
» 4 — Aspect de l'*Actinomyces Allenbachii* en goutte pendante (jus de pomme de terre).
» 5 — Pigment de l'*Actinomyces Allenbachii* à l'état de perchlorate.
» 6 — Pigment de l'*Actinomyces Allenbachii* à l'état de chlorhydrate.
» 7 — Spectre d'absorption du pigment de l'*Actinomyces Allenbachii* en solution alcoolique à 0,45 mgr. % sous 25 mm. d'épaisseur.

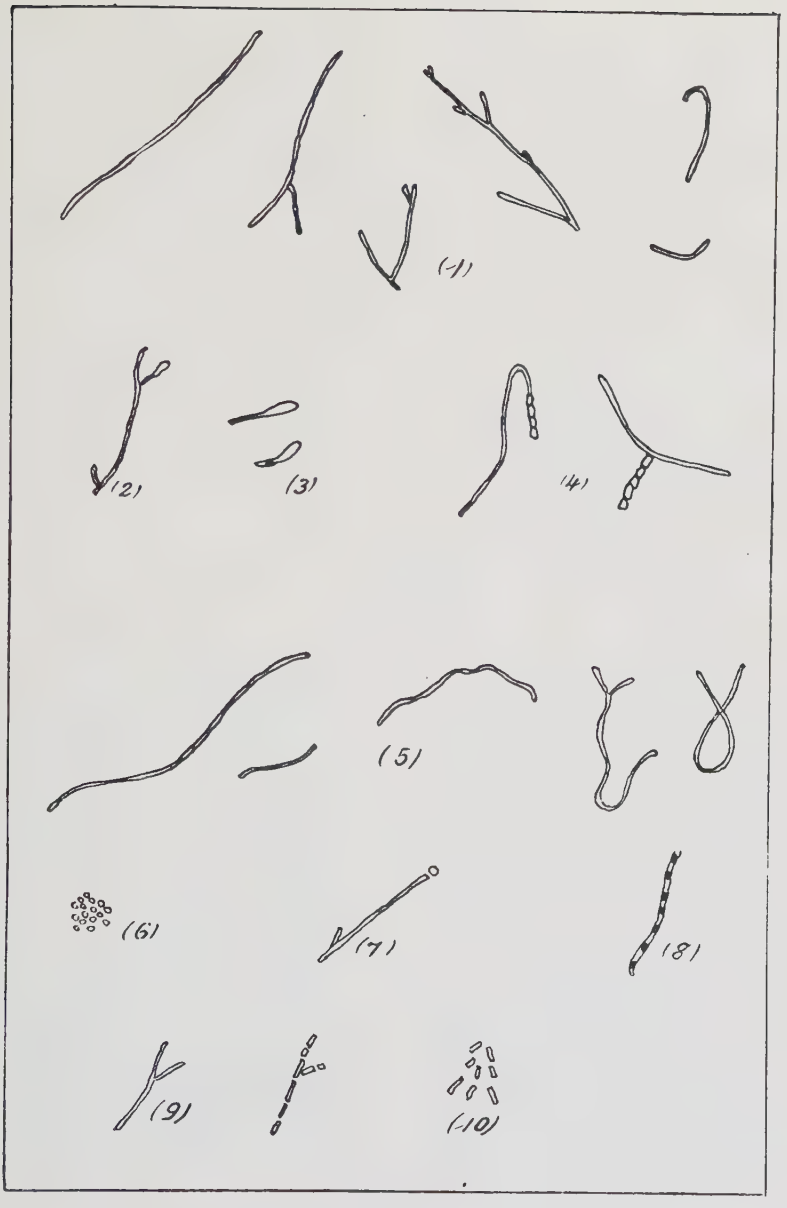


Planche I

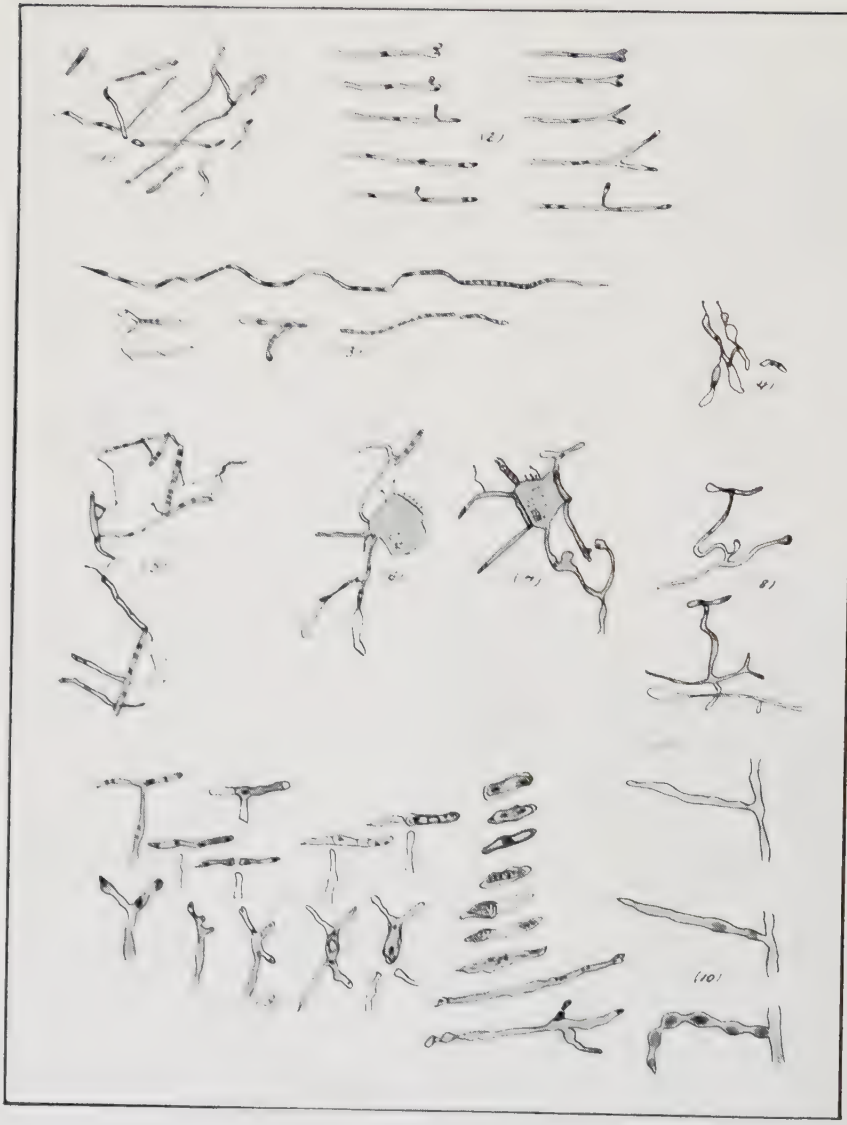


Planche II

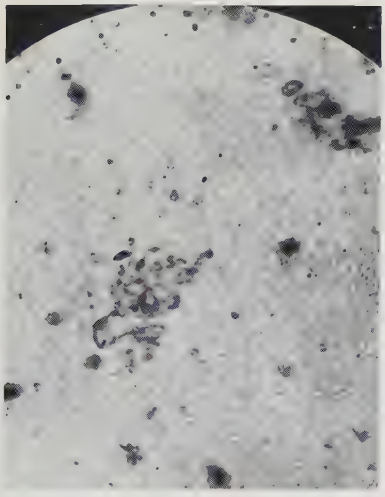


Fig. 1

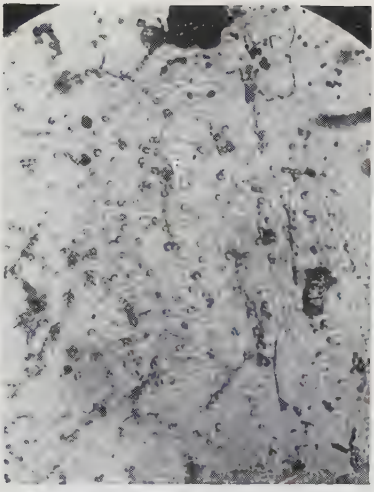


Fig. 2

Fig. 3

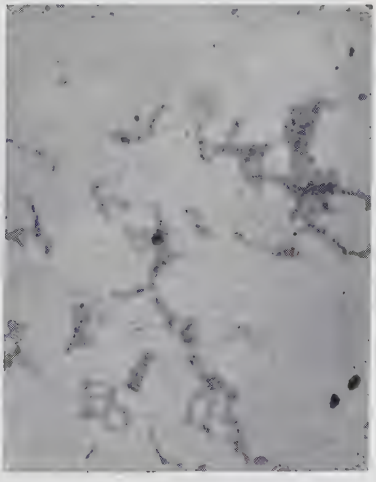


Fig. 4

Fig. 5

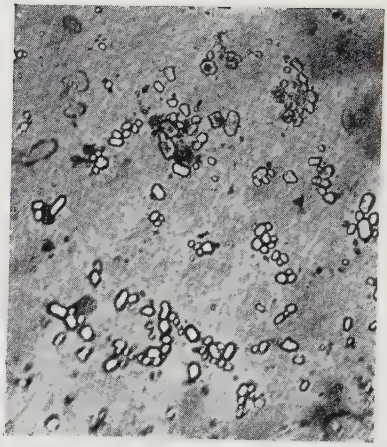


Fig. 6

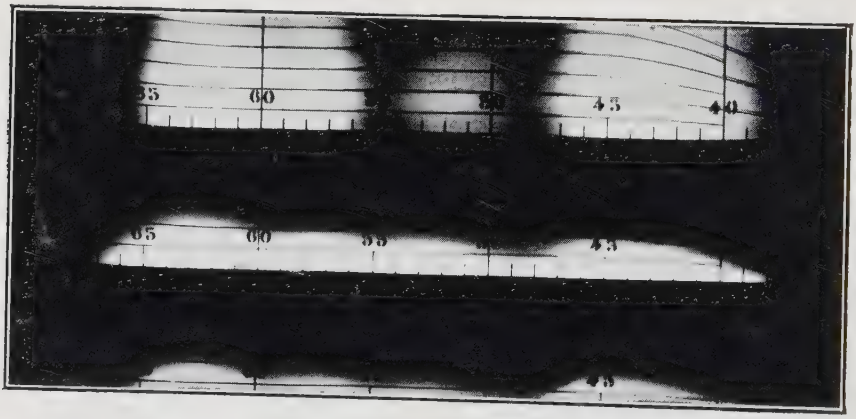


Fig. 7.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 1

Première Partie

HISTORIQUE

Chapitre I. Généralités sur les Actinomyces, leur place dans la classification 5

Chapitre II. Généralités sur les Actinomycoses, Actinomycose pulmonaire 11

Chapitre III. Actinomyces chromogènes 19

Chapitre IV. Les principaux pigments microbiens étudiés jusqu'à présent 23

Deuxième Partie

RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre I. Etude morphologique et biologique de l'Actinomyces pulmonalis var. gracilis; ses caractères culturaux sur les différents milieux 35

Chapitre II. Propriétés biochimiques et protéolytiques 45

Chapitre III. Action pathogène expérimentale. Recherches sérologiques au moyen du sang de malade 51

Chapitre IV. Etude morphologique et biologique de l'Actinomyces Allenbachii; ses caractères culturaux sur les différents milieux 63

Chapitre V. Propriétés biochimiques et protéolytiques 83

Chapitre VI. Influence des matières azotées sur la croissance de l'Actinomyces et sur la production du pigment ..... Recherches sur l'assimilation de la peptone au moyen du réfractomètre de Fery 87

Chapitre VII. Action pathogène expérimentale. Recherches sérologiques au moyen du sang de malade 95

Chapitre VIII. Conditions d'apparition du pigment; sa localisation 99

Chapitre IX. Essais de séparation du colorant, sa caractérisation 101

Conclusions générales 107

Notes bibliographiques 109

Table des figures 115

Table des matières 117

Vu :
Strasbourg, le 4 juin 1932
Le Président du Jury,
A. SARTORY

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 6 juin 1932
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
F. JADIN

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 8 juin 1932
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,
Pour le Recteur,
Le Vice-Président du Conseil de
l'Université
MERKLEN

Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg